

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini memiliki ruang lingkup pada ilmu Farmakologi dan Biokimia.

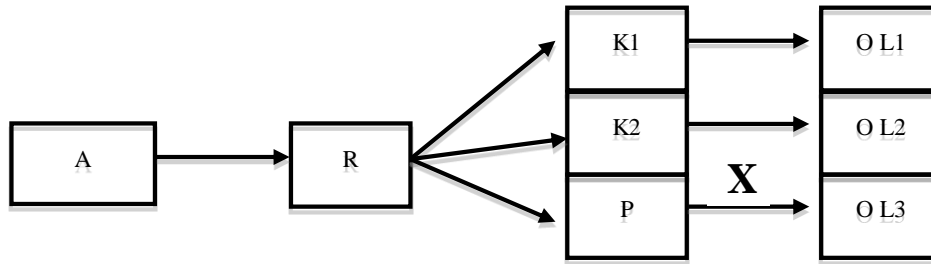
#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Tempat : -Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT)  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.  
-Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah  
Mada, Yogyakarta  
-Laboratorium Kimia Universitas Diponegoro, Semarang

Waktu : Maret-Mei 2016

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini berjenis *true experimental post-test only with control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 500 mg/hari pada tikus *Sprague dawley* yang diberi paparan asap rokok sebanyak 4 batang per/hari.



**Gambar 6.** Skema Desain Penelitian

Keterangan :

- A : Adaptasi. Pada kelompok ini sampel hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* untuk beradaptasi selama 7 hari.
- R : Randomisasi. Sampel akan dibagi ke dalam 3 kelompok secara acak
- K1 : Kelompok kontrol negatif yang hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* selama 28 hari.
- K2 : Kelompok kontrol positif akan diberikan pakan standar, air minum dan paparan asap rokok dengan dosis empat batang dalam sehari pada pagi dan sore hari. Perlakuan ini dilakukan selama 28 hari.
- P : Kelompok perlakuan akan diberikan pakan standar, air minum, paparan asap rokok dengan dosis empat batang dalam sehari pada pagi dan sore hari selama 28 hari dan ekstrak jintan hitam melalui sonde lambung dengan dosis 500 mg/hari akan diberikan dari hari ke-8 sampai ke-28.
- OL1 : Kadar MDA kelompok K1
- OL2 : Kadar MDA kelompok K2
- OL3 : Kadar MDA kelompok P

### **3.4 Populasi dan Sampel**

#### **3.4.1 Sampel**

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus *Sprague Dawley* yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus *Sprague Dawley* dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme mirip dengan manusia.

#### **3.4.2 Kriteria Inklusi**

- 1) Tikus jantan *Sprague Dawley*
- 2) Usia tikus 12 minggu
- 3) Berat badan tikus 200-250 gram

#### **3.4.3 Kriteria Eksklusi**

- 1) Kelainan anatomis pada tikus
- 2) Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit
- 3) Tikus Mengalami diare selama masa penelitian
- 4) Perubahan perilaku tikus (tidak mau makan, lemas)
- 5) Tikus mati saat penelitian.
- 6) Penurunan berat badan tikus lebih dari 10%

#### **3.4.4 Cara Sampling**

Alokasi sampel dengan menggunakan metode *Simple Random Sampling*.

### 3.4.5 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompoknya, sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat penelitian berlangsung. Mengingat terdapat 2 kelompok kontrol dan 1 kelompok perlakuan pada penelitian ini, maka total tikus yang dibutuhkan selama penelitian berjumlah 18 ekor. Penentuan jumlah tikus untuk masing-masing kelompok sesuai dengan ketentuan yang dikeluarkan oleh WHO yaitu minimal 5 ekor tikus untuk setiap kelompoknya.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas : ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*)

Variabel terikat : kadar MDA serum tikus *Sprague Dawley*

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 2.** Definisi Operasional

| No. | Variabel                                       | Definisi Operasional dan Cara Pengukuran  | Unit              | Skala   |
|-----|--|---|-------------------|---------|
| 1.  | Ekstrak Jintan Hitam ( <i>Nigella sativa</i> ) | Ekstrak diperoleh dengan metode soxhletasi. Ekstrak jintan hitam diberikan pada tikus <i>Sprague Dawley</i> dengan dosis 500 mg/hari melalui sonde lambung dan diencerkan dengan 4 ml aquades | mg                | Nominal |
| 2.  | Kadar MDA                                      | Parameter peroksidasi lipid yang dapat diukur dalam darah. Kadarnya ditentukan dengan pemeriksaan spektrofotometer yang menggunakan metode TBARS dengan $\lambda$ 545 nm                      | $\mu\text{mol/L}$ | Rasio   |

### 3.7 Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Alat

- 1) Kandang tikus
- 2) Sonde lambung
- 3) Timbangan
- 4) Spuit
- 5) Spektrofotometer
- 6) Cuvet
- 7) Mikropipet
- 8) Tabung reaksi
- 9) Sentrifuse
- 10) Waterbath
- 11) Vortex

#### 3.7.2 Bahan

- 1) Tikus *Sprague Dawley*
- 2) Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*)
- 3) Rokok kretek
- 4) Pakan standard dan air minum
- 5) Larutan TCA 15%
- 6) Larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N
- 7) Aquades

### 3.7.3 Jenis Data

Kadar MDA serum setelah pemberian Ekstrak *Nigella sativa* dan paparan asap rokok merupakan data primer.

### 3.7.4 Prosedur Kerja

#### 1) Penentuan Dosis Terapi

Beberapa penelitian menjelaskan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam pada sampel tikus sebanyak 1-2 g/KgBB/hari selama 10 hari dapat menunjukkan efek terapeutik.<sup>9 10</sup> Penelitian lain menyebutkan bahwa pemberian ekstrak jintan hitam sebanyak 3 g/KgBB belum menunjukkan efek toksik dari ekstrak tersebut.<sup>63</sup> Berdasarkan hal-hal tersebut, peneliti memutuskan untuk memberikan ekstrak jintan hitam dengan dosis sebesar 2 g/kgBB/hari, atau sebesar 2 mg/gBB/hari.

Selanjutnya sesuai dengan salah satu kriteria inklusi sampel yaitu berat badan hewan coba berkisar antara 200-250 g, maka didapatkan dosis ekstrak jintan hitam yang harus diberikan berkisar antara 400-500 mg/hari, sesuai dengan berat badan hewan coba. Namun guna memberikan kepastian dan kemudahan peneliti dalam memberikan ekstrak tersebut, maka ditetapkan dosis terapi harian yang diberikan menjadi 500 mg/hari untuk seluruh hewan coba.

#### 2) Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel tikus *Sprague Dawley* akan dikandangkan secara berkelompok di LPPT UGM. Selama penelitian berlangsung, sampel akan mendapatkan pakan dan air minum standar yang sama. Untuk adaptasi,

sampel hanya akan diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum* selama tujuh hari pertama. Selanjutnya, sampel akan dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok sebagai berikut.

1) Kelompok Kontrol Negatif (K1)

Kelompok kontrol negatif hanya akan diberikan pakan standar dan air minum *ad libitum*.

2) Kelompok Kontrol Positif (K2)

Kelompok kontrol positif akan diberikan pakan standar, air minum *ad libitum*, dan paparan asap rokok dengan dosis empat batang per hari, yang diberikan pagi dan sore hari.

3) Kelompok Perlakuan Ekstrak Jintan Hitam (P)

Kelompok perlakuan ekstrak jintan hitam akan diberikan pakan standar, air minum *ad libitum*, paparan asap rokok dengan dosis empat batang per hari yang diberikan pagi dan sore hari selama 28 hari, dan ekstrak jintan hitam dengan dosis 500mg/hari yang diberikan melalui sonde lambung pada hari ke-8 hingga hari ke-28.

Perlu diketahui bahwa kelompok K2 dan P akan diadaptasikan terlebih dahulu terhadap asap rokok selama tujuh hari sebelum diberi perlakuan.

### **3) Pemaparan Asap Rokok**

Tikus akan dimasukkan ke dalam kandang khusus pemaparan asap rokok. Kandang khusus ini mempunyai beberapa bilik yang saling terhubung dengan lubang-lubang pada panelnya. Tikus akan dipapari asap

rokok, baik asap rokok *mainstream* maupun *sidestream*. Ujung rokok yang dibakar akan menghasilkan *sidestream smoke* dan ujung ini dimasukkan ke dalam kandang, sedangkan ujung lain yang dihisap (menghasilkan *mainstream smoke*) akan dihubungkan dengan mesin pemompa dan *mainstream smoke* akan dimasukkan melalui bagian kandang yang lain. Rokok yang dipakai adalah rokok kretek merk tertentu dengan kadar tar 39 mg dan nikotin 2,3 mg.

#### 4) Pemeriksaan Kadar MDA

Pemeriksaan kadar MDA serum dengan metode *thiobarbituric acid-reactive substances* (TBARS) diukur menggunakan alat spektrofotometer. Pengambilan darah untuk pemeriksaan MDA pada tikus *Sprague dawley* diambil melalui *pleksus vena retro-orbita*.

- a. Ambil darah vena sebanyak 3cc, masukkan dalam tabung sentrifuge
- b. Masukkan sampel darah (3cc) yang telah disentrifuge pada kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit, ambil supernatannya sebanyak 200 µl masukkan ke dalam tabung sentrifuge yang kosong.
- c. Tambahkan dengan larutan TCA 15% sebanyak 2 ml.
- d. Tambahkan dengan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N.
- e. Panaskan dalam waterbath pada suhu 95°C selama 60 menit.
- f. Sentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm.
- g. Ambil supernatan dan masukkan dalam cuvet.
- h. Baca absorbansi supernatan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm dengan blanko berupa TCA dan TBA.



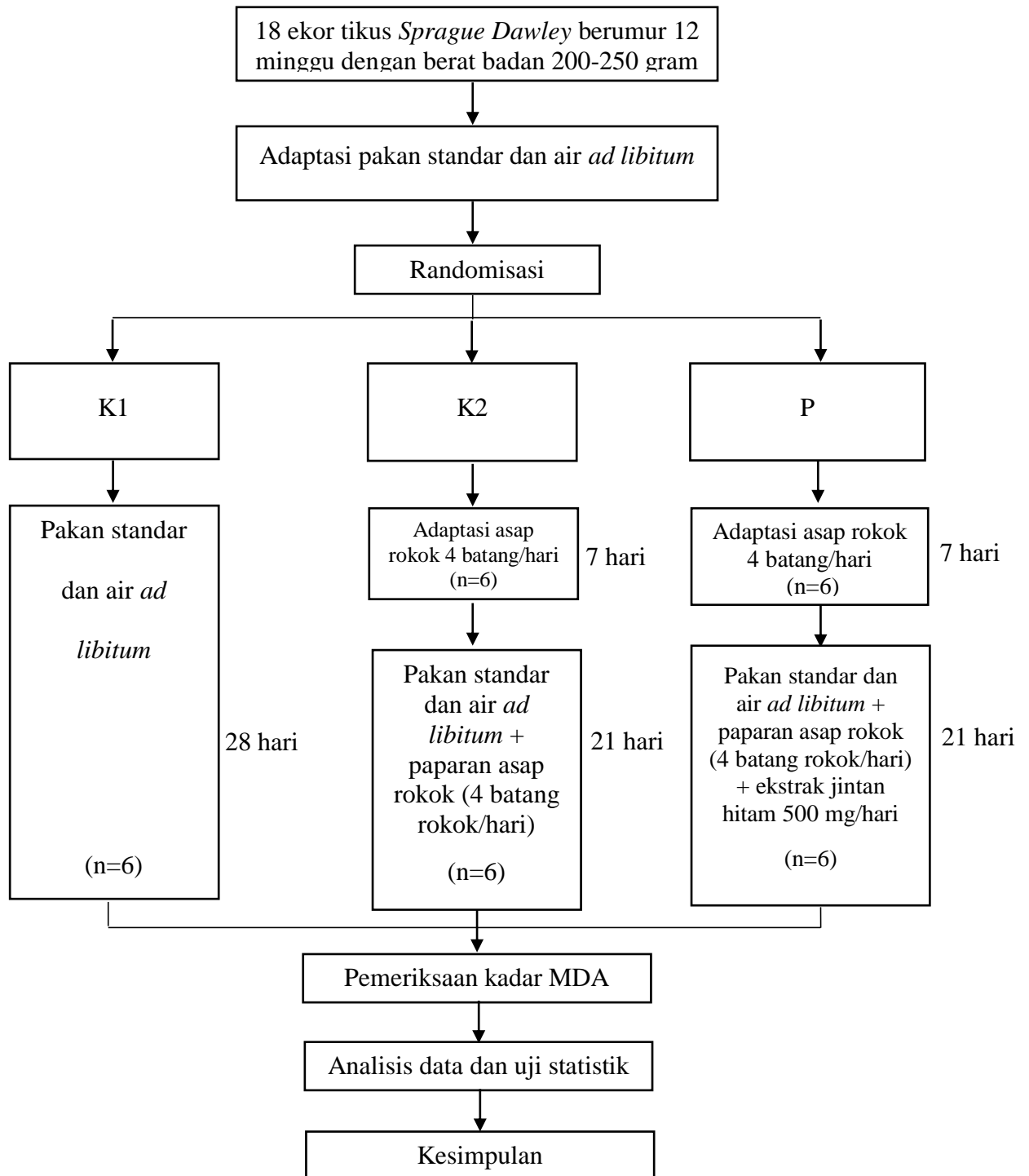
- i. Lakukan juga pembacaan pada 2 panjang gelombang dibawah 545 nm dan diatas 545 nm.
- j. Kemudian kadar MDA didapatkan menggunakan rumus :

$$\text{MDA (dalam } \mu\text{mol/L)} = \frac{0.2422 + \text{absorbansi}}{0.0241}$$

### 3.8 Analisis Data

Data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data dan uji *levene's test* untuk melihat homogenitas data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan yang bermakna akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila  $p \leq 0,05$  pada interval kepercayaan 95%.

### 3.9 Alur Penelitian



**Gambar 8.** Diagram alur penelitian

### **3.10 Etika Penelitian**

*Ethical Clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RSUP Dr. Kariadi dengan nomor 619/EC/FK-RSDK/2016

### 3.11 Jadwal Penelitian

**Tabel 3.** Jadwal Penelitian

| Kegiatan                 | November |   |   |   | Desember |   |   |   | Januari |   |   |   | Februari |   |   |   | Maret |   |   |   | April |   |   |   | Mei |   |   |   | Juni |   |   |   |
|--------------------------|----------|---|---|---|----------|---|---|---|---------|---|---|---|----------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|-----|---|---|---|------|---|---|---|
|                          | 1        | 2 | 3 | 4 | 1        | 2 | 3 | 4 | 1       | 2 | 3 | 4 | 1        | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1     | 2 | 3 | 4 | 1   | 2 | 3 | 4 | 1    | 2 | 3 | 4 |
| Studi literature         |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Penyusunan proposal      |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Seminar proposal         |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| <i>Ethical Clearance</i> |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Persiapan alat dan bahan |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Persiapan laboratorium   |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Penelitian               |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Analisis data            |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Penyusunan laporan       |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |
| Seminar hasil            |          |   |   |   |          |   |   |   |         |   |   |   |          |   |   |   |       |   |   |   |       |   |   |   |     |   |   |   |      |   |   |   |