

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Farmakologi, Biokimia, dan Gizi.

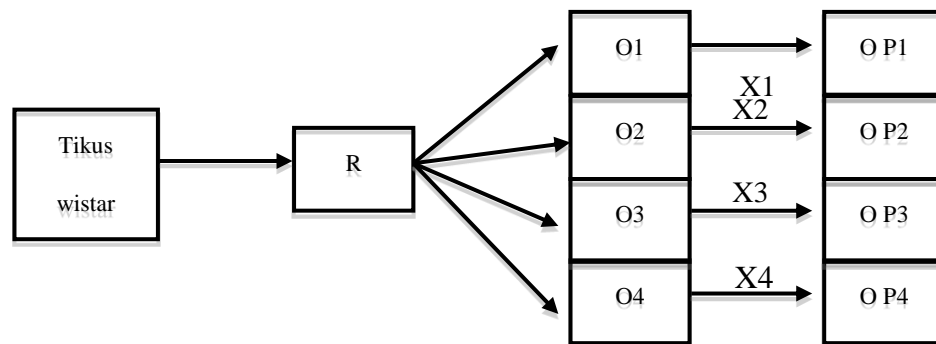
3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di dua tempat yaitu Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang untuk pembuatan ekstrak jahe merah. Sedangkan untuk pengandangan hewan coba, pemberian paparan asap, pemberian ekstrak jahe merah, dilakukan di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pengambilan darah hewan coba, pemeriksaan dan analisis kadar MDA dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan bulan Februari – April 2016. Waktu pemberian perlakuan terhadap hewan coba selama 21 hari.

3.3 Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain yang dipakai adalah *Pre and Post Test Control Group Design*. Penelitian ini dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberikan suatu tindakan serta membandingkan antara kadar MDA saat belum diberi perlakuan dengan kadar MDA setelah diberi perlakuan. Perlakuan

yang diberikan yaitu dengan pemberian jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) dan pemberian paparan asap rokok pada tikus, sedangkan keluarannya (*outcome*) adalah kadar MDA darah tikus.



Gambar 9. Skema Desain Penelitian

Keterangan :

R : Randomisasi

O1 : Kadar MDA darah kelompok 1 sebelum perlakuan

O2 : Kadar MDA darah kelompok 2 sebelum perlakuan

O3 : Kadar MDA darah kelompok 3 sebelum perlakuan

O4 : Kadar MDA darah kelompok 4 sebelum perlakuan

X1 : Kontrol negatif yang diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde placebo selama 7 hari

X2 : Kontrol positif 1 yang diberi pakan standar, sonde placebo dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Perlakuan ini dilakukan selama 7 hari tiap perlakuan.

- X3 : Kontrol positif 2 yang diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde ekstrak jahe merah selama 7 hari pula.
- X4 : Kelompok perlakuan selama 7 hari diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Selama 7 hari setelah pemaparan asap rokok diberikan ekstrak jahe merah melalui sonde lambung dengan dosis 200 mg/kgbb/hari.
- OP1 : Kadar MDA darah kelompok 1 setelah perlakuan
- OP2 : Kadar MDA darah kelompok 2 setelah perlakuan
- OP3 : Kadar MDA darah kelompok 3 setelah perlakuan
- OP4 : Kadar MDA darah kelompok 4 setelah perlakuan

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Sampel

Sampel minimal yang digunakan pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus wistar jantan yang dikandangkan dalam kandang individual yang terbuat dari bahan *stainless steel* dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus wistar jantan dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme mirip dengan manusia. Sampel

penelitian yang digunakan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus wistar jantan
- Berat badan tikus normal (150-220 gram)
- Usia 7 minggu sebelum dilakukan adaptasi

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- Kelainan anatomis pada tikus
- Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

3.4.2.3 Kriteria Drop Out

- Tikus mengalami penurunan berat badan $> 10\%$ (berat badan kurang dari 150 gram)
- Mengalami diare selama masa penelitian
- Perubahan perilaku (tidak mau makan, lemas)
- Tikus mati saat penelitian.

3.4.2.4 Cara Sampling

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

3.4.2.5 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO *dalam Research Guideline for Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicines*, yaitu jumlah minimal 5 ekor tiap kelompok.³⁰ Penelitian ini minimal menggunakan 6 ekor tikus per kelompok untuk persiapan bila terdapat kriteria drop out sehingga dibutuhkan total 24 tikus.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

- Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*)
- Paparan asap rokok

3.5.2 Variabel Tergantung

- Kadar MDA darah

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Unit	Skala
1.	Paparan Asap Rokok	Perlakuan untuk menginduksi agar terjadi stres oksidatif pada tikus berupa paparan asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis satu batang rokok per dua puluh menit selama enam puluh menit, dua kali sehari, yaitu pukul 09.00 dan 14.00	Menit	Nominal
2.	Ekstrak Jahe Merah (<i>Zingiber officinale var. Rubrum</i>)	Rimpang jahe merah sebanyak 11 gram di maserasi pelarut etanol 96% diberikan pada tikus wistar dengan dosis 200mg/kgbb/hari dalam 1,2 ml suspensi CMC 0,25% peroral	ml	Nominal
3.	Kadar MDA	Parameter peroksidasi lipid yang dapat diukur dalam darah. Pemeriksaan kadar MDA dibaca pada spektrofotometer menggunakan metode TBARS dengan λ 545 nm	IU/L	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

- a. Kandang tikus
- b. Sonde lambung
- c. Timbangan
- d. Tabung reaksi
- e. Alkohol 96%
- f. Disposable syringes
- g. Kuvet
- h. Mikropipet 100 ul
- i. Stop watch/ timer
- j. Smoking pump
- k. Smoking chamber
- l. Spectrofotometer
- m. Sentrifuse
- n. Vortex
- o. Waterbath
- p. Pemantik
- q. Kertas saring whatman no.1

3.7.2 Bahan

- a. Tikus jantan
- b. Ransum pakan standar untuk hewan coba
- c. Rokok
- d. Ekstrak jahe merah

3.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan kadar MDA setelah pemberian ekstrak jahe merah pada tikus paska paparan asap rokok merupakan data primer yang bersifat kuantitatif.

3.7.4 Cara Kerja

1. Asap Rokok

Hewan coba ditempatkan dalam kandang hewan sesuai dengan kelompoknya. Pada saat akan diberi paparan asap rokok, hewan coba dipindahkan dalam kandang khusus berupa kotak yang di dalamnya terdapat jeruji pembatas untuk memisahkan hewan coba dengan ujung rokok yang terbakar, sehingga hewan coba dapat secara langsung terkena paparan asap rokok tersebut. Kotak perlakuan memiliki dua lubang, dimana fungsi lubang pertama; sebagai jalan arus pengeluaran asap yang dipaparkan, sedangkan fungsi lubang kedua; untuk memasukkan ujung rokok yang dibakar. Adapun asap rokok dihembuskan berulang kali dengan bantuan spuit sampai rokok habis terbakar. Asap rokok diberikan dua kali setiap hari, pada jam 09.00 dan jam 14.00 wib.

2. Pembuatan Ekstrak Jahe Merah

a. Pengumpulan, Penyiapan, dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Rimpang jahe merah yang telah dikumpulkan, dipilih yang kondisinya baik, dengan usia kira-kira menjelang panen, lebih kurang 10 bulan. Rimpang lalu dibersihkan menggunakan air mengalir sampai bersih lalu ditiriskan. Rimpang yang diperoleh sebanyak 11 gram, lalu diiris tipis-

tipis, setelah itu diangin-anginkan di dalam ruangan terbuka, kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering pada suhu 40-50⁰C hingga kering. Rimpang yang telah kering diserbukkan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan mesh 25, kemudian ditimbang.

b. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Rimpang Jahe Merah

Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol jahe merah adalah maserasi. Serbuk kering jahe merah yang diperoleh sebanyak 240 g, dimasukkan ke dalam botol coklat, lalu ditambahkan 1 L etanol 96% (Penna, Medeiros, Aimbire, Faria, Sertie, & Lopes, 2003), dikocok selama 6 jam dengan menggunakan *shaker*, kemudian didiamkan sampai 24 jam (*Monografi ekstrak*, 2004). Ampasnya dipisahkan dengan cara disaring dengan kertas saring. Proses diulangi beberapa kali sampai filtrat menjadi tidak berwarna. Semua filtrat yang diperoleh dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* bertekanan rendah pada suhu 50°C dengan kecepatan putar 30 rpm. Selanjutnya, filtrat pekat diuapkan diatas penangas air pada suhu 50°C hingga menjadi ekstrak kental.

c. Penetapan Rendemen, Susut Pengeringan, Penetapan Rendemen

Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dibandingkan bobotnya dengan serbuk simplisia awal yang digunakan. Perbandingan tersebut dinyatakan dalam % (persen).

d. Penetapan Susut Pengerinan

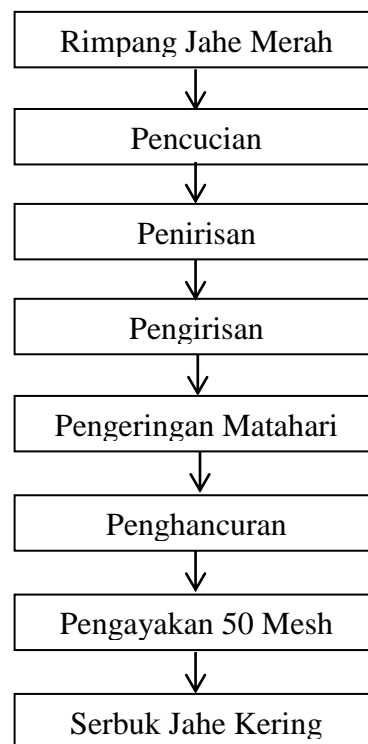
Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram sampai 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang telah dipanaskan pada suhu 105°C hingga selama 30 menit dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, tutup dibuka dan dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar.

e. Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak disuspensikan menggunakan CMC (*Carboxymethylcellulose*) 0,25% sebagai bahan pensuspensi. Sebanyak 400 mg serbuk CMC ditaburkan pada lumpang berisi aquadest panas bersuhu 70⁰C dengan volume 10 ml. Kemudian CMC dibiarkan mengembang selama kurang lebih 10 menit. CMC yang telah mengembang tersebut digerus bersama ekstrak, dan ditambahkan perlahan-lahan dengan aquadest sambil dihomogenisasi, hingga mencapai volume suspensi 80 ml. Suspensi ini disimpan dalam lemari pendingin. Untuk menjaga kestabilan suspensi tersebut, suspensi baru akan dibuat dan diberikan pada hewan coba menjelang percobaan. Pemberian pada hewan coba dilakukan secara oral dengan teknik sonde.

f. Pembuatan Larutan CMC 0,25%

Sebanyak 500 mg CMC ditimbang lalu dikembangkan dengan aquadest hangat (70°C) dengan volume lebih kurang 10 ml. Setelah mengembang, CMC digerus dan ditambahkan aquadest sambil dihomogenisasi hingga mencapai volume suspensi 100 ml.



Gambar 10. Skema Pembuatan Serbuk Jahe Merah Kering³⁵

3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Seluruh sampel dikandangkan secara individual di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Selama penelitian, wistar mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari

seluruh wistar hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*. Pada hari ke-1 setelah adaptasi, wistar dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok yaitu, kelompok 1 (K1) : Kontrol negatif yang nantinya akan diberi pakan standar, kelompok 2 (K2) : Kontrol positif yang diberikan paparan asap rokok dan pakan standar selama 7 hari, kelompok 3 (K3): Diberi pakan standar selama 7 hari dan sonde ekstrak jahe merah 200mg/kgBB/hari selama 7 hari, kelompok 4 (K4): Diberi pakan standar selama 7 hari, sonde ekstrak jahe merah selama 7 hari dan paparan asap rokok 7 hari sebelum diberi jahe merah. Dosis pemberian ekstrak jahe merah yaitu sebesar 200 mg/kgBB/hari, dimana penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak jahe merah berpengaruh terhadap penurunan SGPT hepar tikus putih dalam dosis 200mg/kgBB/hari.³⁶

Sebelum diberi perlakuan, dilakukan pengambilan sampel darah untuk kelompok K1, K2, K3 dan K4. Pengambilan sampel juga dilakukan saat setelah terpapar rokok 7 hari dan setelah diberi jahe merah selama 7 hari.

3.7.5 Pengambilan Data

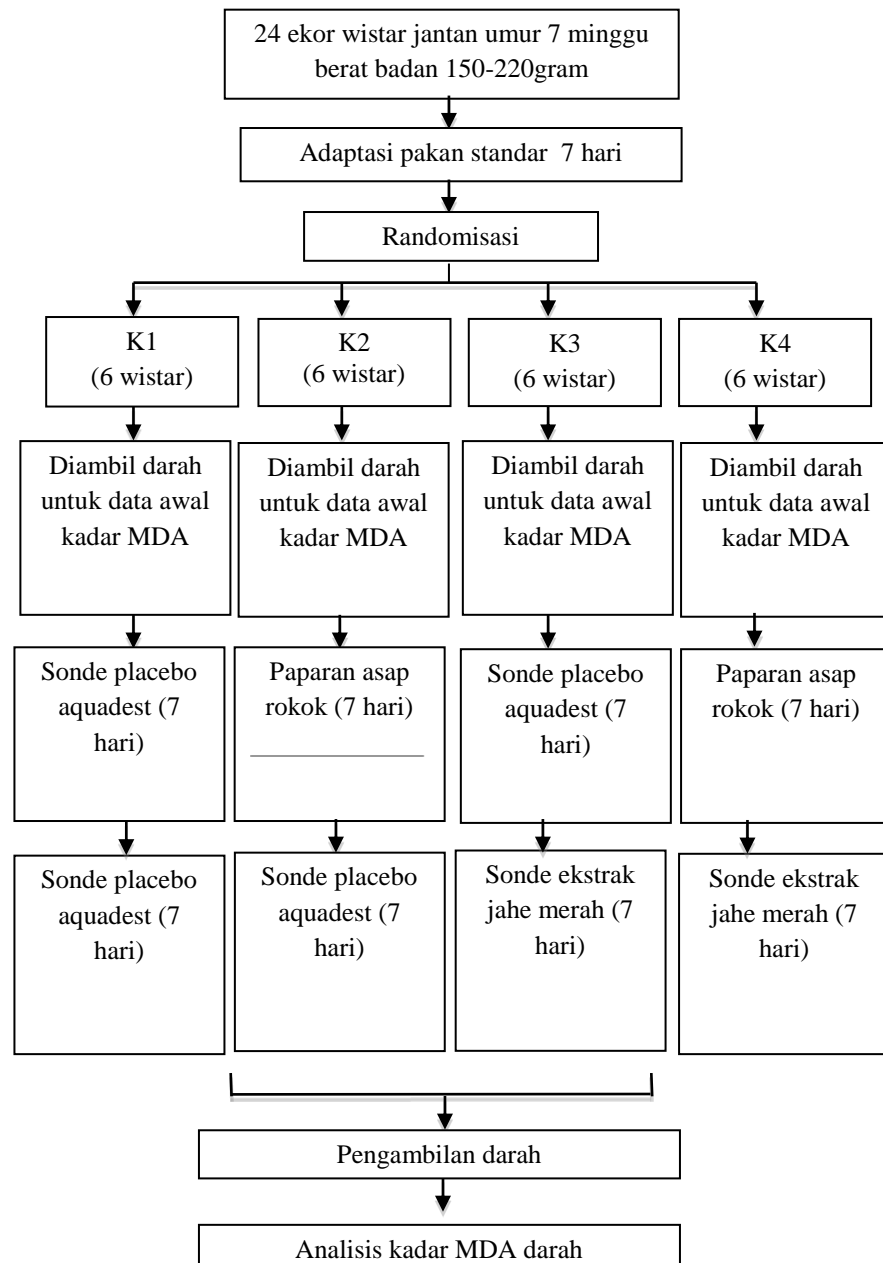
Pemeriksaan kadar MDA darah ditentukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Pengambilan darah untuk pemeriksaan MDA sebelum perlakuan pada tikus Wistar diambil melalui ekor tikus dan setelah perlakuan pada tikus wistar diambil melalui *medial canthus sinus orbitalis*.

- a. 1 ml sampel ditambah 4 ml TBA reagen, lalu di vortex.
 - b. Inkubasi dengan waterbath pada suhu 90 derajat celcius selama 80 menit.
- Setelah itu, Dinginkan dengan air es selama 10 menit.

- c. Tambahkan tiap tabung dengan 1600 μ l atau 4 ml larutan ekstraksi butanol dan kemudian di vortex.
- d. Sentrifuge 3.000 rpm selama 20 menit.
- e. Supernatan diambil kurang lebih 750 μ l.
- f. Baca absorbansi supernatan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm (terdapat pemilihan 3 panjang gelombang sekaligus yaitu 510,532 dan 560 nm) dengan blanko.
- g. Kemudian kadar MDA didapatkan menggunakan rumus :

$$\text{MDA (dalam nmol/ml)} = \frac{0.2422 + \text{absorbansi}}{0.0241}$$

3.8 Alur Penelitian



Gambar 12. Diagram Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan program SPSS 18 *for Windows*. 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. Berdasarkan data statistik yang didapat, data berdistribusi normal dan dilakukan uji *One Way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada penelitian ini maka tidak dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok.

3.10 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dilakukan, dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang. *Ethical clearance* pada penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik penelitian kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-RS.Dr.Kariadi dengan nomor surat yaitu No.351/EC/FK-RSDK/2016.

3.11 Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Des				Jan				Feb				Mar				Apr			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi Literatur	■	■																		
Survei Laboratorium			■	■																
Penulisan Proposal			■	■	■	■	■													
Seminar Proposal								■												
Revisi Proposal									■											
Penelitian										■	■	■								
Analisis data dan Evaluasi													■	■	■					
Penulisan Laporan																	■	■	■	■
Seminar Laporan																				■