

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong sebagai penelitian *True Experimental* melalui rancangan penelitian post test-only control group dengan hewan percobaan berupa tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) di mana kadar timbal (Pb) dalam darah tikus setelah perlakuan akan diukur.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini diadakan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dan uji AAS akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan diadakan pada bulan November 2023 sampai selesai.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi di penelitian ini yaitu tikus putih jantan *strain wistar*, yang dipilih karena daya tahan tubuhnya lebih kuat, mudah didapatkan, mudah dipelihara, serta respon biologisnya yang hampir serupa dengan manusia.

4.3.2 Sampel

Sampel yang dipilih berupa tikus putih jantan *strain wistar* dengan berat badan 150-200 gram sejumlah 20 ekor berusia 2-3 bulan sesuai kriteria inklusi dalam penelitian.

4.3.3 Besar Sampel

Rumus *Degree of Freedom* dipilih supaya besar sampel di penelitian ini bisa diketahui (Arifin & Zahiruddin, 2017)

$$DF = N - k = kn - k = k(n - 1),$$

Keterangan:

N : *total number of subjects*

k : *number of groups*

n : *number of subjects per group.*

dengan menyusun ulang formula, n bisa dianggap sebagai:

$$n = DF/k + 1$$

Sehingga banyak sampel yang diperlukan:

Minimum jumlah $n = 10/k+1 = 10/4+1 = 4$ tikus per kelompok

Maksimum jumlah $n = 20/k+1 = 20/4+1 = 6$ tikus per kelompok

Pengukuran besar total sampelnya:

Minimum jumlah $N = \text{Minimum } n \times k = 4 \times 4 = 16$ tikus

Maksimum jumlah $N = \text{Maksimum } n \times k = 6 \times 4 = 24$ tikus

Perhitungan tersebut membuktikan bahwa jumlah sampel yang diperlukan untuk melakukan analisis varian dalam penelitian ini adalah setidaknya 16 ekor tikus. Ditambahkan 1 ekor tikus cadangan lagi pada setiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi risiko *drop out* yang tinggi akibat 2 kali penyondean (sonde Pb pada pagi hari dan sonde ekstrak enam jam setelahnya). Sehingga total tikus yang dibutuhkan berjumlah 20 ekor.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Berupa teknik *simple random sampling* dalam menentukan tikus putih

kelompok perlakuan masing-masing di tempat penelitian.

4.3.5 Karakteristik Sampel

4.3.5.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan
2. Sehat ditandai dengan gerakan aktif dan mata jernih
3. Massa badan tikus 150-200 gram
4. Umur tikus 2-3 bulan

4.3.5.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang sakit selama proses penelitian
2. Tikus yang cacat fisik
3. Tikus yang mati selama proses penelitian

4.3.6 Variabel Penelitian

4.3.6.1 Variabel Bebas

Berupa dosis ekstrak etanol buah asam jawa.

4.3.6.2 Variabel Tergantung

Berupa kadar timbal dalam darah tikus putih jantan setelah 14 hari perlakuan.

4.3.6.3 Variabel Kontrol

Berupa dosis larutan timbal asetat yang diinduksikan pada tikus putih jantan *strain wistar*.

4.3.7 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Pengukuran
Ekstrak etanol buah asam jawa	Yakni ekstrak yang diperoleh melalui metode maserasi menggunakan etanol 96% yang didapatkan langsung dari Materia Medica, Jl. Lahor No. 87, Kota Batu.	Dosis ekstrak daging buah asam jawa, dosis 1 12,5 mg/kgBB tikus, dosis 2 25mg/kgBB tikus dan dosis 3 50mg/kgBB tikus.	Ordinal
Timbal asetat	Berupa serbuk timbal asetat ($Pb(CH_3COO)_2$) yang diperoleh dari Aldila Kimia, Jl. Brigjend Slamet Riadi No.105, Malang. Serbuk timbal asetat tersebut dilarutkan ke 1 ml pelarut akuades (Suprijono et al., 2011)	Dosis timbal asetat yang diberikan sebanyak 10mg/hari (Suprijono, et al., 2011)	Numerik
Uji AAS kadar timbal darah	Kadar timbal darah tikus yang diperoleh hendak diuji melalui AAS (Atomic Absorbance Spectrophotometry) yang merupakan teknik analisis yang digunakan untuk menentukan konsentrasi	Pembacaan kandungan timbal menggunakan AAS	Numerik

	<p>atom atau ion logam dalam suatu sampel (Sari, 2009). Pada penelitian ini digunakan pelarut berupa asam nitrat (HNO_3) (Mardani, 2005).</p>		
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

a. Alat pemeliharaan dan perlakuan tikus

- 1) Sonde oral
- 2) Sarung tangan
- 3) Masker
- 4) Kandang tikus
- 5) Tempat makanan
- 6) Tempat minuman
- 7) Timbangan digital analitik

b. Alat pembuatan ekstrak etanol buah asam jawa

- 1) Gelas ukur
- 2) *Blender*
- 3) Kertas saring
- 4) *Laboratory water bath*
- 5) Wadah penyimpanan ekstrak buah asam jawa

6) Pengaduk

7) Tabung Reaksi

c. Alat pembuatan larutan timbal asetat

1) Gelas ukur

2) Pengaduk

3) Wadah penyimpanan larutan

4) Gelas *beaker*

5) Timbangan elektrik

d. Alat pembedahan dan pengambilan darah tikus:

1) *Centrifuge*

2) Jarum

3) Kloroform

4) Pinset

5) Pengait Jaringan

6) Gunting bedah

7) Papan Bedah

8) Sarung tangan

9) Spuit 5 cc

10) Vacutainer dengan EDTA

e. Alat Uji AAS

1) *Atomic Absorbance Spectrophotometer*

4.4.2 Bahan

a. Untuk pemeliharaan tikus putih jantan

- 1) Akuades
- 2) Pakan Standar

b. Bahan pembuatan ekstrak etanol buah asam jawa

- 1) Buah asam jawa (*T. indica*)
- 2) Etanol 96%
- 3) Akuades

c. Bahan untuk pembuatan larutan timbal asetat

- 1) Akuades
- 2) Serbuk timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)

d. Bahan untuk induksi timbal asetat

- 1) Akuades
- 2) Larutan timbal asetat 10mg/hari/ekor

4.5 Dasar Dosis

4.5.1 Dosis Timbal

Timbal yang akan dipilih berupa timbal asetat trihidrat [$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]. Menurut penelitian sebelumnya dari Suprijono (2011), pemberian dosis timbal asetat 10 mg/hari selama 14 hari mampu menyebabkan kerusakan pada jaringan lunak tikus. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Mahdi (2019) juga menunjukkan bahwa pemberian timbal asetat trihidrat pada konsentrasi 10 mg/hari yang sudah diencerkan dengan akuades selama 14 hari melalui sonde oral mengakibatkan kerusakan pada berbagai organ tikus seperti ginjal, hepar dan jejunum. Apabila pada dosis 10 mg/hari induksi timbal asetat sudah dibuktikan

dapat mengakibatkan kerusakan organ maka pada dosis tersebut juga kadar timbal dalam darah akan memberikan efek terhadap darah itu sendiri. Sehingga pada penelitian ini dosis timbal asetat yang digunakan sebanyak 10 mg/hari diberikan secara oral melalui sonde dan sebelumnya dilarutkan dalam 1 ml akuades pada pagi hari dan satu jam sebelum disonde sisa pakan tikus akan diambil.

4.5.2 Dosis Ekstrak Etanol Buah Asam Jawa (*T indica*)

Dasar dalam melakukan perhitungan dosis ekstrak daging buah asam jawa yaitu penelitian terdahulu yang juga menggunakan ekstrak buah tersebut yakni dari Obafemi et al., (2019) menunjukkan bahwa dengan dosis ekstrak buah asam jawa 25mg/kgBB berbagai kandungan aktifnya terutama asam sitrat dan *ascorbic acid* dapat bekerja sebagai *chelating agent* dari logam timbal dan menurunkan kadar timbal dalam darah. Dalam menentukan variasi dosis yang akan digunakan akan memakai rumus variasi dosis $\frac{1}{2}n$, n , serta $2n$.

Pada penelitian ini, dosis ekstrak etanol buah asam jawa yang dipilih sebagai dasar penentuan variasi dosis adalah 25mg/kgBB tikus. Sehingga perhitungan dosis ekstrak etanol buah asam jawanya sebagai berikut:

Dosis 1 : 12,5mg/kgBB tikus.

Dosis 2 : 25mg/kgBB tikus

Dosis 3 : 50mg/kgBB tikus

Setiap dosisnya hendak dikategorikan dengan massa jenis ekstrak buah asam jawa, untuk menentukan jenis ekstrak akan dihitung menggunakan alat piknometer yang menggunakan rumus, sebagai berikut:

$$\text{Massa Jenis } (p) = \frac{\text{Massa Ekstrak}}{\text{Volume Ekstrak}}$$

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Proses Adaptasi

Proses penyesuaian dilakukan dengan meletakkan tikus sebagai hewan coba dalam kandang selama 7 hari supaya tikus dapat beradaptasi terhadap lingkungan yang baru. Selama masa adaptasi, tikus mendapat pakan standar BR-1 dan air minum yang cukup, kandangnya diatur dengan pencahayaan yang cukup dan mulai dilatih penggunaan sonde agar pada saat perlakuan dimulai tikus sudah terbiasa.

4.6.2 Pembagian Kelompok dan Perlakuan Tikus

Sesudah proses adaptasi selama 7 hari, tikus selanjutnya akan ditimbang untuk menentukan rerata berat badan agar dosis larutan timbal asetat dan ekstrak etanol buah asam jawa dapat ditentukan. Sebanyak 20 ekor tikus putih jantan akan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, berupa kelompok kontrol positif (K+), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), serta perlakuan 3 (P3) yang setiap kelompoknya akan terdiri dari empat tikus dan satu cadangan kemudian setiap kelompoknya ditempatkan pada kandang yang terpisah.

Pemberian ekstrak etanol buah asam jawa pada tiap kelompok akan dilakukan secara terpisah, dosis timbal asetat lalu 6 jam kemudian diberikan dosis ekstrak etanol buah asam jawa. Perlakuan tersebut akan dilaksanakan setiap hari selama 14 hari (Aulanni'am, 2019):

Kelompok K+ : Diinduksikan timbal asetat sebanyak 10 mg/hari per oral dan dilarutkan dengan 1 ml akuades, tanpa diberi dosis ekstrak etanol buah asam jawa selama 14 hari.

Kelompok P1 : Diinduksikan timbal asetat sebanyak 10mg/hari per oral kemudian diberikan ekstrak ekstrak etanol buah asam jawa 12,5mg/kgBB tikus/hari selama 14 hari.

Kelompok P2 : Diinduksikan timbal asetat sebanyak 10mg/hari per oral kemudian diberikan ekstrak etanol buah asam jawa 25mg/kgBB tikus/hari selama 14 hari.

Kelompok P3 : Diinduksikan timbal asetat sebanyak 10mg/hari per oral kemudian diberikan ekstrak etanol buah asam jawa 50mg/kgBB/tikus/hari selama 14 hari.

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Asam Jawa (*T indica*)

Tanaman asam jawa akan diidentifikasi terlebih dahulu di Materia Medica Batu untuk proses determinasi tanaman. Buah asam jawa yang diperoleh sebanyak 1000g dibersihkan dan dikeringkan pada oven suhu 50°C hingga diperoleh simplisia kering sebanyak 150g. Simplisia buah asam jawa sebanyak 150g dilakukan perendaman dalam 3x24 jam menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 500mL hingga terendam semuanya di dalam wadah tertutup rapat. Maserat disaring dengan kertas saring *Whatman* dan ditampung ke dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Filtrat diuapkan untuk menghilangkan pelarutannya, ekstrak cair dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat 60g ekstrak buah asam jawa (Imrawati, 2016; Sustikawati *et al.*, 2021). Ekstrak yang dihasilkan akan disimpan di suhu -20°C sampai digunakan untuk perlakuan (Chong *et al.*, 2012).

4.6.4 Pemberian Ekstrak Etanol Buah Asam Jawa (*T indica*)

Pada pagi hari diberikan induksi dengan pemberian larutan timbal asetat sonde per-oral, setelah 6 jam induksi timbal dilanjutkan pemberian ekstrak etanol

buah asam jawa sonde per-oral selama 14 hari perlakuan. Diberikan interval selama 6 jam antara pemberian timbal dan ekstrak etanol buah asam jawa oleh karena mekanisme pengosongan isi lambung tikus berkisar antara 4-6 jam (Creedon et al., 2013). Sehingga pemberian perlakuan akan dilakukan di jam 08.00 pagi dan jam 14.00 WIB. Untuk jarak induksi dan pemberian pakan akan diberikan interval selama 1 jam sehingga tidak terjadi interaksi.

4.6.5 Proses Anastesi

Sesudah 14 hari selanjutnya dilaksanakan proses pembedahan dan pengambilan darah tikus. Proses tersebut dilaksanakan secara satu per satu terhadap hewan percobaan di mana hewan percobaan dimasukkan ke dalam toples kaca yang sudah diisi kapas dicampur dengan kloroform. Anastesi dilaksanakan secara inhalasi pada hewan percobaan dengan dosis 0,67 ml/hewan coba selama 60 detik, anastesi dilaksanakan hingga tikus pingsan dan tidak bergerak lagi, kemudian dihitung selama 20 detik, apabila ada *recovery* maka segera lakukan prosedur *euthanasia* dengan metode *cervical dislocation* (Alexandru, 2011).

4.6.6 Proses Pembedahan dan Pengambilan Sampel Plasma Darah

Hewan coba yang sudah dilakukan anastesi dan dipastikan sudah teranastesi dengan baik dan benar selanjutnya diletakkan di papan pembedahan kemudian difiksasi menggunakan jarum. Setelah itu dilaksanakan pembedahan dengan memakai pengait jaringan dan gunting bedah untuk mengambil sampel darah tikus. Dengan spuit 5 cc dan jarum ukuran 23G-25G, sampel darah tikus diambil dari ventrikel jantung \pm 3-5 cc, pastikan selama proses pengambilan darah dilakukan dengan perlahan untuk mencegah jantung mengalami kolaps. Sampel darah kemudian dimasukkan ke vacutainer dengan EDTA dan *disentrifuge* selama 15

menit untuk memisahkan sel darah merah dan plasma (Parasuraman et al.,2010).

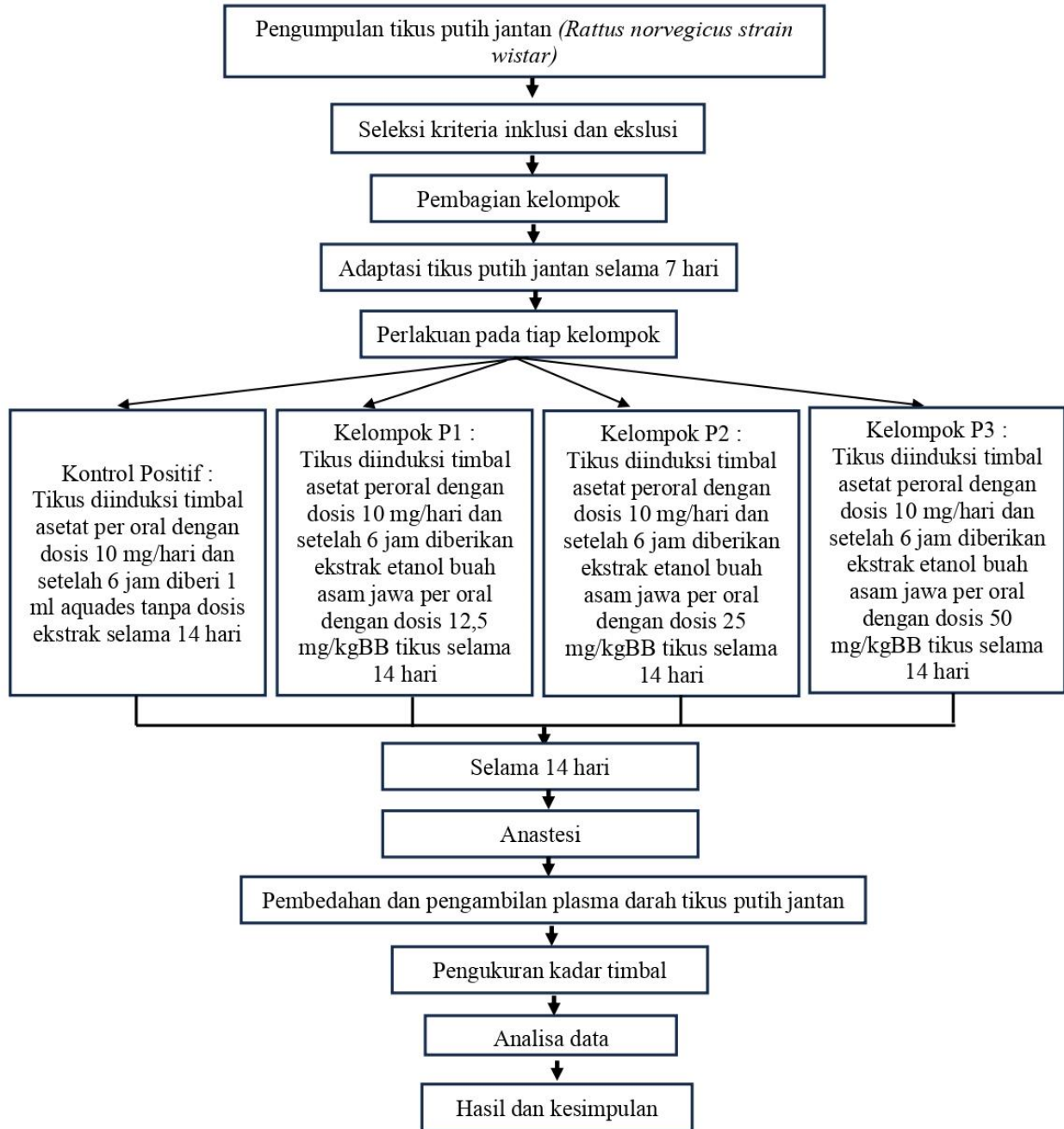
4.6.7 Penanganan Tikus setelah Tindakan Pembedahan

Hewan coba yang sudah dibedah harus dipastikan tidak mengalami proses *recovery*. Pastikan juga denyut nadi sudah berhenti sebelum mengubur hewan coba merupakan tindakan yang wajib dilakukan. Hewan percobaan yang mengalami proses *recovery* harus dilakukan tindakan eutanasia, salah satu hal yang bisa dilaksanakan yaitu dengan melakukan *cervical dislocation*. Vertebrae yang terpisah dari otak akan membuat refleks kedip menghilang, rasa sakit menghilang yang membuat hewan coba tidak merasakan sakit setelah proses pembedahan. Setelah hewan percobaan sudah dipastikan mati, hewan percobaan dikumpulkan menjadi satu, kemudian dilakukan proses penguburan (Alexandru, 2011).

4.6.8 Uji AAS

Sampel darah tikus akan diuji kadar timbalnya melalui metode AAS di Laboratorim Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang , dengan cara mencampurkan 0,5 ml atau 0,5 gram dari sampel plasma darah ditambahkan dengan 65% asam nitrat sebanyak 7 mL dan aquadest sebanyak 3 mL. Hasil pencampuran kemudian dipanaskan menggunakan hotplate pada suhu 200C sampai didapatkan larutan yang jernih. Selanjutnya hasil larutan didinginkan dan disaring lalu dipindahkan ke labu ukur dengan ukuran 10 mL dan ditandabatkan dengan aquadest. Sampel hasil destruksi diukur menggunakan AAS model AA240 pada panjang gelombang 283,3 nm (Hidayati et al., 2014).

4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisa Data

Seluruh data yang didapatkan akan dianalisis melalui uji normalitas , uji homogenitas, uji varian satu jalan (*One Way Anova*) atau uji *Kruskal Wallis* , uji *post hoc* serta uji regresi linier melalui program SPSS versi 26 untuk Windows.

4.8.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Apabila didapatkan nilai Sig. < 0.05 maka data dikatakan tidak terdistribusi normal, sedangkan apabila nilai Sig > 0.05 maka data dikatakan terdistribusi normal.

4.8.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah beberapa varian populasi adalah sama atau tidak sebagai syarat analisis varian satu jalan *One Way Anova*. Sebuah data yang diujikan dapat dikatakan homogen berdasarkan nilai signifikasinya. Apabila didapatkan nilai Sig. ≥ 0.05 berarti kelompok data tersebut berasal dari populasi dengan varians yang sama (homogen) sedangkan apabila didapatkan nilai Sig. < 0.05 berarti kelompok data tersebut berasal dari populasi dengan varians yang berbeda (tidak homogen).

4.8.3 Uji *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* adalah salah satu uji statistik nonparametrik yang dapat digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dengan dependen. . Uji ini merupakan alternatif dari uji *One Way Anova* apabila data yang diperoleh tidak berdistribusi normal. Jika nilai *Asymp.Sig* > 0.05 maka tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok, sedangkan jika didapatkan nilai *Asymp.Sig* < 0.05 maka terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok.

4.8.4 Uji *One Way Anova*

Uji varian satu jalan (*One Way Anova*) dipilih supaya mengetahui seberapa signifikan pengaruh ekstrak etanol buah asam jawa terhadap kadar timbal dalam darah tikus yang diinduksi timbal asetat. Syarat dilakukannya uji *One Way Anova* adalah sebaran data normal dan homogen, untuk mengetahui data tersebar normal dilakukan uji Shapiro-Wilk di mana data tersebut dianggap berdistribusi normal apabila nilai sig $> 0,05$ dan tidak berdistribusi normal bila nilai sig $< 0,05$, dan untuk mengetahui kehomogenan data dilakukan uji Levenes di mana data dianggap memiliki varians sama apabila nilai sig $> 0,05$ dan dianggap memiliki varians yang tidak sama bila nilai sig $< 0,05$.

Bila sebaran data didapatkan tidak normal, maka transformasi data dilakukan terlebih dahulu dan bila hasil transformasi didapatkan normal maka dapat dilanjutkan ke uji *One way Anova*, tetapi bila sebaran data tetap tidak normal maka dilakukan uji Non-parametrik Kruskal-Wallis dan uji Post-Hoc Mann-Whitney.

4.8.5 Uji *Post-Hoc*

Dilakukan sebagai lanjutan dari uji *One Way Anova* supaya diketahui adanya perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok kontrol serta kelompok perlakuan. Bila varian data yang didapatkan homogen maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Bonferroni* sedangkan apabila varian data yang didapatkan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Tamhane*.

4.8.6 Uji Regresi Linier

Uji Regresi yang dilaksanakan di penelitian ini berupa uji regresi linier karena variabelnya berupa numerik. Tujuannya supaya mengetahui seberapa besar hubungan antara dosis ekstrak etanol buah asam jawa terhadap kadar timbal darah tikus putih jantan yang diinduksi timbal asetat per oral.

4.9 Jadwal Penelitian

Nomor	Uraian Kegiatan	Bulan			
		1	2	3	4
1	Mengurus surat <i>Ethical Clearance</i> dan surat determinasi	■			
2	Mempersiapkan alat dan bahan penelitian	■	■		
3	Proses adaptasi tikus, membuat ekstrak etanol buah asam jawa dan membuat larutan timbal asetat		■		
4	Memaparkan timbal asetat dan uji AAS			■	
5	Pemberian Ekstrak etanol buah asam jawa dan uji AAS			■	
6	Menganalisa data			■	
7	Penyusunan laporan hasil penelitian				■