

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan dikelompokkan menjadi 7 kelompok dengan 5 kali ulangan antara lain kontrol positif, perlakuan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0 mg/gr, 0,1mg/gr, 0,2mg/gr, 0,3mg/gr, 0,4mg/gr dan 0,5mg/gr berat badan.

#### **3.2 Variabel Penelitian**

##### **3.2.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan yang terjadi (Nurhayati, 2007). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dan timbal aasetat dengan konsentrasi 0,3 mg/ gram berat badan.

##### **3.2.2. Variabel Terikat**

Variabel terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas (Nurhayati, 2007). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar enzim d-ALAD, kadar hemoglobin, morfologi dan jumlah eritrosit mencit.

### 3.2.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat (Nurhayati, 2007). Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jenis kelamin jantan, dengan berat badan 20-30 gr, usia 2-3 bulan sebanyak 35 ekor, daun kelor (*Moringa oleifera*) muda 5-6 tangkai dari ujung batang, minuman mencit secara *ad libitum* dan makanan jenis *pellet*.

### 3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2013-Januari 2014 di Laboratorium Fisiologi hewan, Laboratorium Optik dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

**Tabel 3.1 :Rancangan waktu penelitian**

Kegiatan	Desember				Januari			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Aklimatisasi		v						
Ekstraksi			v					
Perlakuan timbal			v					
Perlakuan ekstrak etanol daun kelor ( <i>Moringa oleifera</i> )				v	v			
Pengambilan data						v		

### 3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus*) dengan 7 kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor. Jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20-30 gram sebanyak 35 ekor.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba (bak plastik), tempat makan dan minum tikus, alat pencekok oral (sonde modifikasi), timbangan analitik, hot plate, labu ukur 100 ml, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 500 ml, beaker glass 250 ml, kaca glass, *objek glass*, corong Buchner, ayakan tepung/ kertas saring, *hand counter*, pipet tetes, seperangkat alat bedah, botol spesimen, rotari evaporator, mikroskop komputer, kertas label, kapas, spidol permanen, hemositometer, spektrofotometer, selang Thoma, pipet tetes, pH meter.

#### 3.5.2 Bahan

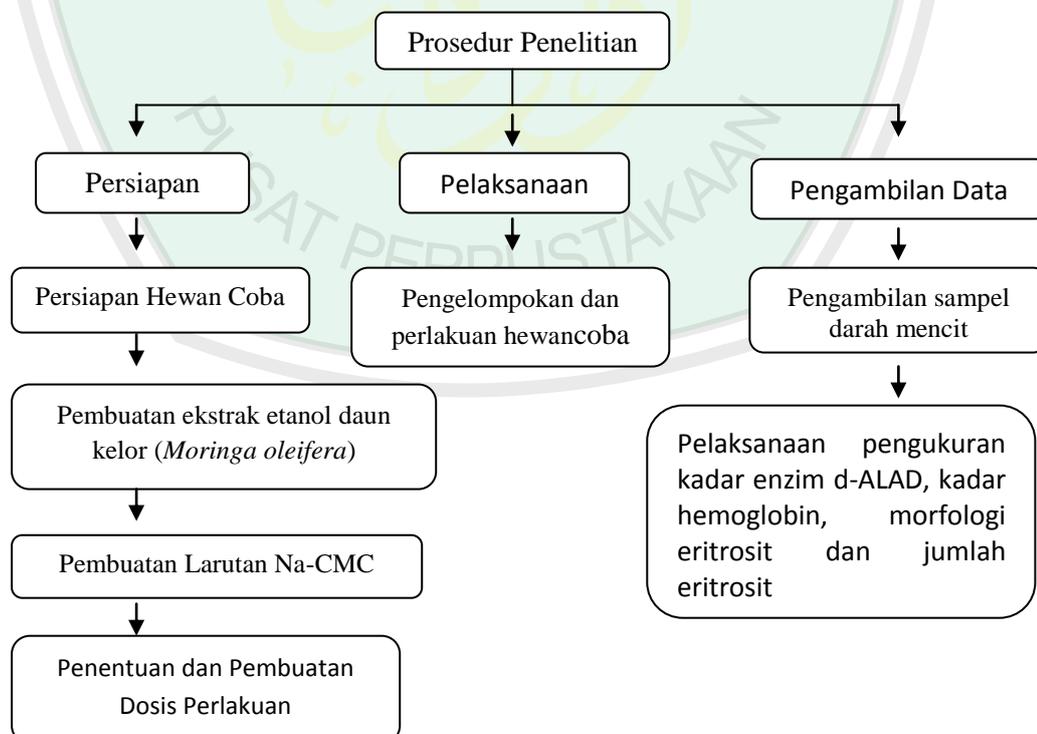
Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*), aquades, pakan mencit berupa, etanol 70%, kloroform 90%, EDTA, CMC 0,5%, serutan kayu, larutan Drabkins (mengandung Kalium Ferrisianida dan Kalium Sianida), larutan Hayem, Na-CMC,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , d-ALA, Tricloro asetat (TCA),  $\text{HgCl}_2$ ,

Triton X 100, p-dimethylaminobenzaldehyde, asam asetat glacial, dan asam perklorat.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu :

1. Tahap persiapan : tahap yang meliputi persiapan hewan coba (aklimatisasi), pembuatan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*), pembuatan larutan Na CMC dan penentuan dan pembuatan dosis perlakuan.
2. Tahap pelaksanaan : tahap yang meliputi pengelompokan dan perlakuan hewan coba.
3. Tahap pengambilan data : tahap meliputi pengambilan sampel darah hewan coba dan proses analisis kadar enzim d-ALAD, kadar hemoglobin, morfologi eritrosit dan jumlah eritrosit.



### 3.6.1 Tahap Persiapan Perlakuan

#### 3.6.1.1 Aklimatisasi dan Pembagian Kelompok

Hewan coba diaklimatisasi sebelum perlakuan dilakukan selama satu minggu (7 hari). Mencit diberi minum secara *ad libitum* (berlebih), makan berupa *pellet* dan dibagi menjadi 7 kelompok dengan masing-masing 5 ulangan seperti berikut:

- K : Kelompok hewan coba kontrol negatif yang mendapatkan perlakuan kontrol (tanpa pemberian timbal asetat dan juga tanpa pemberian ekstrak kelor (*Moringa oleifera*))
- P1 : Kelompok hewan coba kontrol positif yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0 mg/gr BB.
- P2 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/ gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,1 mg/gr BB.
- P3 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/ gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,2 mg/gr BB.
- P4 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/ gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,3 mg/gr BB.
- P5 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/ gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,4 mg/gr BB.
- P6 : Kelompok hewan coba yang mendapatkan pemberian timbal asetat 0,3 mg/ gr BB dan ekstrak kelor (*Moringa oleifera*) dosis 0,5 mg/gr BB.

### 3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Serbuk daun kelor (*Moringa oleifera*) sebanyak 100 gram dimaserasi dengan etanol 70% beberapa kali hingga pelarut menjadi bening. Serbuk yang telah dimaserasi disaring dengan corong *Buncher*. Filtrat yang telah diperoleh dipisahkan dengan rotari evaporator dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya disimpan dan digunakan sebagai perlakuan. Pembuatan stok ekstrak untuk persediaan selama 2 minggu.

### 3.6.1.3 Pembuatan Sediaan Larutan Na-CMC 0,5 %

Sediaan larutan Na-CMC 0,5% dibuat dengan menaburkan 50 mg Na-CMC ke dalam 10 ml aquades dingin, kemudian diaduk hingga homogen kemudian dipanaskan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai gel. Selanjutnya diencerkan dalam labu ukur.

### 3.6.1.4 Perhitungan Dosis Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat BadanMancit

#### A. Jumlah Timbal Asetat Yang Dibutuhkan

$0,3 \text{ mg/gr} = 0,0003 \text{ gr/gr}$  (satunya adalah berat badan mencit). Rata-rata berat badan mencit yang digunakan adalah 20 gram, maka timbal yang dibutuhkan tiap mencit adalah  $0,0003 \times 20 = 0,006 \text{ mg/ mencit}$ . Jadi jumlah timbal asetat yang dibutuhkan untuk 35 mencit adalah  $0,006 \times 35 = 0,21 \text{ mg}$ . Akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihkan maka timbal asetat total stok ditambah hingga menjadi sebanyak 0,3mg.

### **B. Volume Stok Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)**

Volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian (hari)

$$0,5 \text{ (volume sonde)} \times 35 \text{ ekor mencit} \times 7 \text{ hari} = 122,5 \text{ ml}$$

Total stok adalah sebanyak 122,5 ml, akan tetapi dikarenakan dalam praktiknya harus dlebihkan maka volume total stok larutan menjadi sebanyak 130 ml. Larutan stok ini digunakan selama 7 hari perlakuan pemberian timbal asetat.

#### **3.6.1.5 Pembuatan Sediaan Larutan Timbal Asetat 0,3 mg/gr Berat Badan**

Sediaan larutan timbal asetat 0,3 mg/gr berat badan dibuat dengan mengukur stok timbal asetat sebanyak 0,3 mg pada neraca analitik. Kemudian dilarutkan dengan aquades hingga homogen, setelah itu ditambah aquades hingga mencapai volume 130 ml. Hal ini didasarkan pada pemberian timbal asetat pada mencit adalah sebesar 0,5 ml karena batas maksimum lambung mencit adalah 1 ml sehingga total volume yang dibutuhkan selama 7 hari untuk 5 ekor mencit adalah sebesar 105 ml. Dikarenakan volume larutan yang diperlukan dalam praktik selalu melebihi total larutan stok, maka volume larutan ditambah hingga volume 130 ml.

#### **3.6.1.6 Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)**

Berdasarkan hasil penelitian milik Nelma (2008) menyatakan bahwa pemberian vitamin C dengan dosis 0,2 mg/gr berat badan mampu meningkatkan kadar enzim d-ALAD dan hemoglobin. Maka dalam penelitian ini akan digunakan

dosis *Moringa oleifera* yang lebih besar daripada dosis vitamin C yang digunakan oleh Nelma (2008). Dosis *Moringa oleifera* yang digunakan adalah 5 dosis bertingkat dengan rentang 0,1mg/gr berat badan. Dosis *Moringa oleifera* yang digunakan adalah sebagai berikut:

**A. Dosis Perlakuan *Moringa oleifera***

- a. Dosis I : 0 mg/ gr BB per hari = 0 gr/ gr berat badan
- b. Dosis II : 0,1mg/ gr BB per hari = 0,0001 gr/gr berat badan
- c. Dosis III : 0,2 mg/ gr BB per hari = 0,0002 mg/gr berat badan
- d. Dosis IV : 0,3 mg/ gr BB per hari = 0,0003 mg/gr berat badan
- e. Dosis V : 0,4 mg/ gr BB per hari = 0,0004 mg/gr berat badan
- f. Dosis VI : 0,5 mg/ gr BB per hari = 0,0005 mg/gr berat badan

**B. Dosis perlakuan**

Dosis stok = volume sonde (ml) x jumlah mencit (ekor) x lama pemberian  
(hari)

$$\text{Dosis stok} = 0,5 \times 5 \times 14 = 35 \text{ ml}$$

**C. Perhitungan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Tiap Dosis Perlakuan**

- a. Dosis I : 0 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0 gr
- b. Dosis II : 0,0001 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0,007 gr
- c. Dosis III : 0,0002 gr / 0,5 ml = y gr / 35ml ; maka y = 0,014 gr
- d. Dosis IV : 0,0003 gr / 0,5 ml = y gr / 35 ml ; maka y = 0,021 gr

e. Dosis V :  $0,0004 \text{ gr} / 0,5 \text{ ml} = y \text{ gr} / 35 \text{ ml}$  ; maka  $y = 0,028\text{gr}$

f. Dosis VI :  $0,0005 \text{ gr} / 0,5 \text{ ml} = y \text{ gr} / 35\text{ml}$  ; maka  $y = 0,035 \text{ gr}$

Total kebutuhan ekstrak =  $0 + 0,007\text{gr} + 0,014\text{gr} + 0,021\text{gr} + 0,028\text{gr} + 0,035\text{gr} = 0,105 \text{ gr}$

Jadi stok yang dibutuhkan selama 14 hari adalah 0,105gram.

#### D. Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

1. Dosis VI =  $0,105 \text{ gr} \times 0,5 \text{ ml} = 0,0005 \text{ gr} \times k \text{ ml}$

$$k = 105 \text{ ml}$$

Jadi 0,105 gram ekstrak dilarutkan dengan Na-CMC hingga volumenya 105 ml, kemudian diambil 35 ml untuk stok ekstrak dosis VI untuk perlakuan selama 14 hari. Sisa stok sebanyak 70 ml akan diencerkan dan digunakan untuk dosis selanjutnya.

2. Dosis V =  $0,0005\text{gr} \times 70 \text{ ml} = 0,0004 \text{ gr} \times k \text{ ml}$

$$k = 87,5 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan dosis VI sebanyak 70 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 87,5 ml. Diambil 35 ml untuk stok ekstrak dosis V selama 14 hari sehingga sisa larutan adalah sebesar 52,5 ml.

3. Dosis IV =  $0,0004 \text{ gr} \times 52,5 \text{ ml} = 0,0003 \text{ gr} \times k \text{ ml}$

$$k = 70 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis V sebanyak 52,5 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volumenya 70 ml. Diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis IV selama 14 hari sehingga sisa larutan adalah 35ml.

$$4. \text{ Dosis III} = 0,0003 \text{ gr} \times 35 \text{ ml} = 0,0002 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 52,5 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis IV sebesar 35 ml diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 52,5 ml dan diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis III selama 14 hari. Sisa larutan adalah sebesar 17,5 ml.

$$5. \text{ Dosis II} = 0,0002 \text{ gr} \times 17,5 \text{ ml} = 0,0001 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 35 \text{ ml}$$

Jadi sisa larutan ekstrak dosis III sebesar 17,5 ml kemudian diencerkan dengan Na-CMC hingga volume 35 ml. Diambil 35 ml untuk stok larutan ekstrak dosis II selama 14 hari sehingga tidak tersisa larutan stok (0 ml).

$$6. \text{ Dosis I} = 0 \text{ gr} \times 0 \text{ ml} = 0 \text{ gr} \times k \text{ ml}$$

$$k = 0 \text{ ml}$$

### 3.6.2 Tahap Perlakuan

#### 3.6.2.1 Perlakuan Pemaparan Timbal Asetat

Pemaparan timbal asetat yang dilakukan dengan cara menginduksi mencit dengan menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 7 hari

setelah hari ke-7 aklimatisasi pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan P3 (kelompok yang hanya diberi ekstrak *Moringa oleifera* saja).

### **3.6.2.2. Perlakuan Pemberian Ekstrak Etanol *Moringa oleifera***

Pemaparan ekstrak etanol *Moringa oleifera* yang dilakukan dengan cara oral menggunakan sonde lambung atau spuit yang dimodifikasi, yang diberikan sekitar pukul 08.00 WIB pagi dalam jangka waktu 14 hari setelah hari ke-15 aklimatisasi (atau hari ke-8 setelah pemaparan timbal asetat) pada masing-masing mencit perlakuan kecuali pada kelompok kontrol dan P2 (kelompok yang hanya diberi ekstrak timbal asetat saja).

### **3.6.3 Tahap Pengamatan**

#### **3.6.3.1 Pengamatan Morfologi Eritrosit dan Perhitungan Jumlah Eritrosit**

Morfologi eritrosit dilakukan dengan mengamati secara langsung eritrosit menggunakan mikroskop. Kemudian diidentifikasi morfologi eritrositnya. Pengamatan morfologi eritrosit dilakukan dengan menggunakan mikroskop, hemositometer *Improved Neubauer* dan reagensia larutan Hayem. Dalam larutan ini yang tampak adalah eritrosit sedangkan leukosit mengalami lisis (Bijanti, 2002):

1. Sampel darah dihisap dengan pipet Thoma sampai tanda 0,5 dan diencerkan sampai tanda 101. Darah dengan larutan Hayem dicampur dengan menggerak-gerakkan pipet tegak lurus dengan sumbu pipet.

2. Setelah *hemocytometer* dibersihkan, darah yang telah diencerkan dalam pipet dibuang 4 tetes, kemudian diisi pada *hemocytometer* dan ditutup dengan gelas penutup lalu dibiarkan 3 menit agar eritrosit mengendap.
3. *Hemocytometer* yang sudah berisi darah diamati dengan mikroskop, dengan perbesaran lensa obyektif 10 kali sehingga garis batas kamar hitung terlihat jelas. Setelah tampak jelas, lensa obyektif diubah 40 kali kemudian dihitung dan diamati morfologi eritrosit dalam 5 kotak bujur sangkar kecil yang beradaditengah. Morfologi yang diamati adalah bentuk eritrosit (bikonkaf atau tidak). Rumus yang digunakan dalam penelitian milik Bijanti(2002) adalah:

$$\sum \text{Eritrosit (juta/mm}^3\text{)} = \sum \text{eritrosit dalam 5 kotak kecil} \times \frac{1}{\text{volume 5 kotak}} \times \text{pengenceran}$$

### 3.6.3.2 Pengukuran Kadar Hemoglobin

Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan dengan menggunakan metode *Cyanmethemoglobin* berdasarkan Bijanti (2002). Darah diencerkan dengan larutan Drabskin yang mengandung Kalium Ferrisianida dan Kalium Sianida. Kadar hemoglobin diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Cara kerja pengukuran kadar hemoglobin dengan metode *Cyanmethemoglobin* sebagai berikut:

1. Pipet diisi dengan 20  $\mu\text{l}$  darah heparin.
2. Dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi 5 ml larutan Drabskin.
3. Didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar.

4. Diukur absorbansi kadar hemoglobin pada panjang gelombang 540 nm.

### 3.6.3.3 Perhitungan Kadar Enzim d-ALAD

Menghitung kadar enzim d-ALAD dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 555 nm. Ada beberapa macam larutan yang harus disediakan, yaitu antara lain (Nelma, 2008):

- a. Pembuatan larutan triton X-100
  1. Ditimbang triton sebanyak 0,5 ml
  2. Dicampur dengan 500 ml aquades
  3. Diaduk hingga homogen
- b. Pembuatan larutan natrium fosfat pH 6,2
  1. Ditimbang  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 53,72 gram kemudian dilarutkan dalam 500 ml aquades (larutan A).
  2. Ditimbang  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 23,4 gram kemudian dilarutkan dalam 500 ml aquades (larutan B).
  3. Dicampurkan 100 ml larutan A dengan 168 ml larutan B kemudian diukur pH-nya (jika pH-nya lebih besar dari 6,4 maka ditambah fosfat sedikit demi sedikit sedangkan jika kurang dari 6,4 maka ditambah dengan larutan  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ).
- c. Pembuatan larutan d-ALA 125 mmol/L
  1. Ditimbang d-ALA sebanyak 209,5 mg.

2. Dilarutkan dalam 100 ml aquades kemudian disimpan dalam suhu 4°C.

d. Pembuatan larutan trikloro asetat (TCA) 60 g/L yang mengandung HgCl<sub>2</sub> 60 mmol/L

1. Ditimbang TCA sebanyak 15 gram dan HgCl<sub>2</sub> sebanyak 4 gram.
2. Keduanya dilarutkan dalam aquades hingga volume 250 ml .

e. Pembuatan larutan pereaksi Erlich

1. Ditimbang p-dimethylaminobenzaldehyde sebanyak 2 gram
2. Dilarutkan dalam 60 ml asam asetat glasial.
3. Ditambahkan 32 ml asam perklorat 70% sambil diaduk, ditambahkan asam asetat hingga mencapai volume 100 ml.

Sementara itu prosedur yang dilakukan untuk menentukan aktivitas d-ALAD dalam darah adalah sebagai berikut (Nelma, 2008):

1. Diambil sampel darah sebanyak 20 µl dengan mikropipet kemudian dimasukkan dalam tabung mikro.
2. Dimasukkan 100 µl larutan Triton X-100 kedalam tabung mikro yang berisi sampel darah.
3. Dicampur selama 15 detik kemudian diinkubasi dalam *ice-bath* selama 3 menit (untuk menyempurnakan lisis).

4. Ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  buffer natrium fosfat pH 6,4 dan 100  $\mu\text{l}$  larutan d-ALA kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C (khusus untuk blanko, ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  campuran TCA merkuri klorida kemudian diinkubasi semua sampel selama 90 menit pada suhu 37°C).
5. Ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  campuran larutan TCA merkuri klorida untuk menghentikan masa inkubasi.
6. Disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada *Eppendorf microcentrifuge*.
7. Dipindahkan 400  $\mu\text{l}$  larutan supernatan ke tabung lain dan ditambahkan 400  $\mu\text{l}$  pereaksi Erlich (untuk blanko, ditambahkan 400  $\mu\text{l}$  pereaksi Erlich dan 400  $\mu\text{l}$  aquades).
8. Diukur absorbansi aktivitas enzim d-ALAD ( dengan menganalisis kadar porpobilinogen sebagai prekursor pertama adanya gangguan sintesis heme) pada panjang gelombang 555 nm selama 5 menit.
9. Dicatat data hasil pengamatan absorbansi aktivitas enzim d-ALAD.
10. Dianalisis data absorbansi yang diperoleh.

### 3.7 Analisa Data

Analisis yang digunakan adalah ANOVA satu arah untuk data kadar hemoglobin, aktivitas enzim d-ALAD dan jumlah eritrosit. Hal tersebut bertujuan untuk menguji signifikansi dan membandingkan lebih dari dua rata-rata data hasil pengamatan. Apabila dari hasil analisis diperoleh nilai  $F >$  signifikansi 1% yang artinya memiliki signifikansi berbeda sangat nyata, maka perlu dilanjutkan dengan

uji Duncan dengan taraf signifikan 1%. Perlunya dilakukan uji lanjut Duncan karena nilai KK yang lebih dari 10%.

