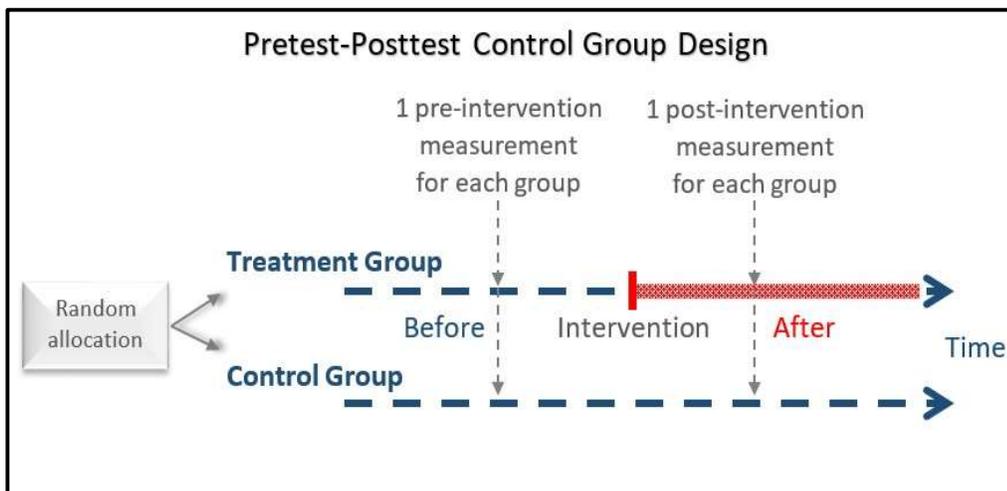


BAB III METODE PENELITIAN

Bab tiga ini menjelaskan metode penelitian yang digunakan, mencakup pendekatan dan desain penelitian, populasi dan sampel penelitian, Definisi Operasional Variabel (DOV), metode penelitian dan teknik analisis data, dan etika penelitian.

3.1 Pendekatan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif untuk menghasilkan data berupa angka dan menggambarkan hasil uji empirik mengenai pengaruh aktivitas di ruang terbuka dan ruang terbuka berpolusi serta pemberian antioksidan terhadap inflamasi paru-paru dan *mitochondrial biogenesis*. Metode penelitian yang digunakan adalah desain *True Experimental* dan *Randomized Posttest-only Control Group*. Lebih lanjut, metode penelitian diilustrasikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Desain *Randomized Post test-only Control Group* (Adaptasi dari Fraenkel, Wallen, & Hyun, 2012)

Berdasarkan metode penelitian yang digunakan maka proses pengumpulan data dilakukan satu kali pada akhir perlakuan/*treatment* dengan menggunakan desain *cross sectional survey*.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah hewan uji yang sesuai dan memenuhi kriteria, yaitu tikus putih jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 8 hingga 10 minggu dengan bobot 200 - 300 g yang diperoleh dari *Biorfarma's Animal Breeding Facility*.

Sampel penelitian dipilih berdasarkan rumus Federer berikut.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok

n = jumlah subjek perkelompok

Mengacu kepada rumus Federer tersebut, jumlah subjek penelitian dalam kelompok lebih dari 2,875. Dalam penelitian ini jumlah subjek kelompok perlakuan adalah 45, karena terdapat 5 anggota dalam kelompok perlakuan. Untuk penelitian ini, tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dipilih karena kemiripannya secara fisiologis dan genetik dengan manusia. Keunggulan tambahan adalah ukurannya yang kecil dan kemudahan dalam perawatannya. Bryda (2013).

Selanjutnya, persyaratan untuk inklusi, eksklusi, dan putus uji sampel dijelaskan sebagai berikut.

1) Kriteria inklusi

Tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*): berusia 8 – 10 minggu dengan berat badan 200 – 225 gram dan memiliki tingkah laku dan aktivitas normal.

2) Kriteria eksklusi

Adanya kelainan kulit yang tampak (luka, borok); tampak rambut kusam dan rontok serta cedera pada saat perlakuan aktivitas.

3) Kriteria putus uji

Tikus sakit yang ditandai dengan berat badan yang menurun lebih dari 10% setelah melakukan adaptasi serta tikus mengalami kematian pada masa adaptasi.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

3.3 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1) Aktivitas di Ruang Terbuka

Penelitian ini melakukan aktivitas fisik di luar ruangan dengan intensitas sedang. Subjek penelitian berlari dengan treadmill tikus dengan intensitas sedang pada kecepatan 20 meter per menit. Kegiatan ini berlangsung selama tiga puluh menit. Kualitas udara dalam kelompok perlakuan tanpa polusi udara dipertahankan dengan kadar $PM_{2.5}$ kurang dari $55,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$; kadar PM_{10} kurang dari $151 \mu\text{g}/\text{m}^3$; dan kadar gas CO kurang dari 25 ppm.

2) Aktivitas di Ruang Terbuka berpolusi

Pada penelitian ini, aktivitas fisik yang berpolusi dilakukan di luar ruangan dan terpengaruh oleh tingkat polusi udara yang disebabkan oleh emisi kendaraan bermotor, pembakaran sampah, dan polutan lainnya. Alat untuk mengukur kualitas udara termasuk kadar karbon monoksida (CO), $PM_{2.5}$, dan PM_{10} . Kadar $PM_{2.5}$ berada di antara $55,5$ dan $250,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$; PM_{10} berada di antara 151 dan $420 \mu\text{g}/\text{m}^3$, atau dalam rentang dari tidak sehat hingga sangat tidak sehat. Untuk kelompok perlakuan tanpa polusi udara, kualitas udara dipertahankan pada 25 ppm hingga 70 ppm.

2) Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu memberikan perlindungan akibat kerusakan oksidatif pada sel-sel tubuh akibat pemaparan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil dengan elektron yang tidak memiliki pasangan, oleh karena itu dapat menyebabkan kerusakan pada struktur seluler dengan mencuri elektron dari molekul lain. Antioksidan memiliki mekanisme kerja dengan cara memberikan elektron pada radikal bebas, sehingga menghentikan reaksi berantai yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Dalam penelitian ini antioksidan yang digunakan adalah ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan dosis 200 mg/kgBB tikus yang merupakan sumber anti-inflamasi alami.

3) Inflamasi Paru-paru

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tubuh menunjukkan peradangan atau inflamasi sebagai respons terhadap gangguan, misalnya infeksi, ruda paksa atau trauma, hipersensitivitas dan sebab lainnya. Respon peradangan atau inflamasi sangat kompleks, menggunakan berbagai proses untuk melawan penyebab kerusakan atau penyakit serta perbaikan jaringan. Patogen atau paparan racun, polutan, iritan, dan alergen biasanya menyebabkan inflamasi di paru-paru. Patogen atau paparan racun, polutan dan alergen biasanya menyebabkan inflamasi di paru-paru. Berbagai jenis sel inflamasi diaktifkan selama proses inflamasi. Masing-masing melepaskan sitokin dan mediator untuk mengubah aktivitas sel inflamasi lainnya. Pada penelitian ini, ekspresi relatif protein interleukin-6 (IL-6) dan *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB) diukur untuk menunjukkan terjadinya proses inflamasi.

4) *Mitochondrial Biogenesis* Paru-Paru

Mitochondrial biogenesis paru-paru adalah proses pembentukan dan memperbanyak mitokondria pada paru. Proses ini sangat penting untuk memastikan fungsi mitokondria yang optimal dalam menghasilkan energi yang dibutuhkan oleh sel paru-paru. Perubahan dalam *mitochondrial biogenesis* dapat terjadi dalam kondisi patologis, seperti penyakit paru-paru atau kondisi inflamasi yang dapat mempengaruhi fungsi mitokondria dan kesehatan paru-paru secara keseluruhan. Pada penelitian ini, *Mitochondrial biogenesis* paru-paru diamati dan diukur menggunakan indikator ekspresi relatif dari protein *peroxisome-proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 alpha* (PGC-1α), *Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20* (TOM20) dan *Cytochrome c oxidase* (COX) IV.

3.4 Alat dan Bahan

1) Alat

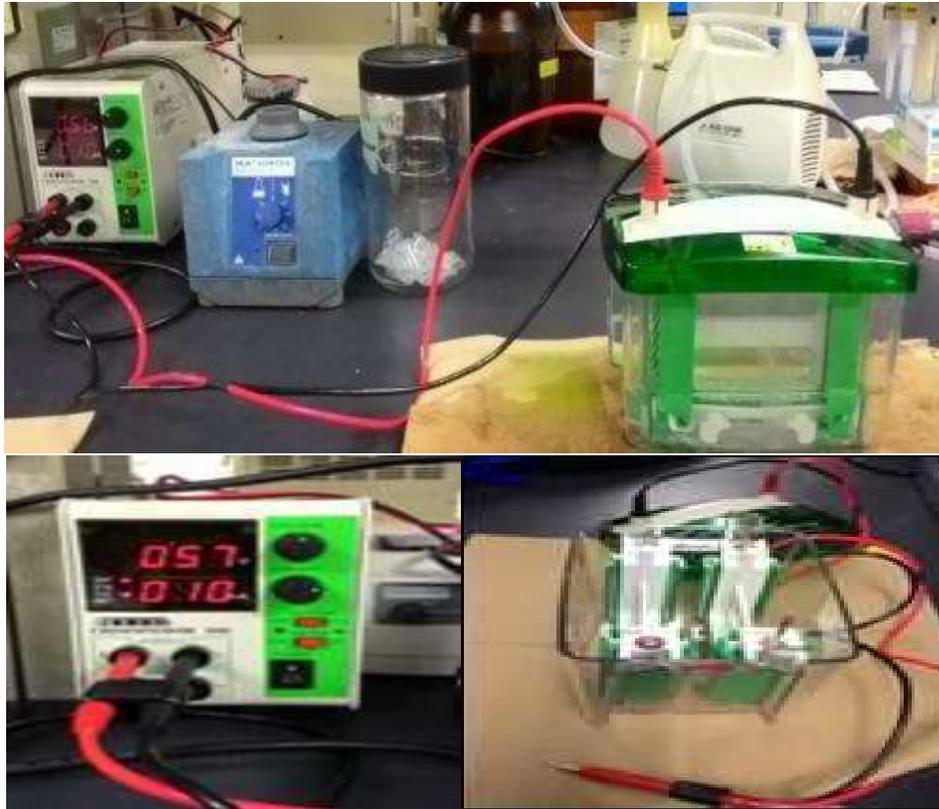
Penelitian ini menggunakan peralatan sebagai berikut.

- (1) *Treadmill* tikus, dibuat sesuai dengan standar baku latihan fisik.
- (2) 9 in 1 CO₂ TVOC *Formaldehyde Humidity Meter Air quality monitor*, alat untuk mengukur kualitas udara dengan parameter partikulat *matter* dan PM_{2.5}, PM₁₀, dan AQI.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

- (3) CO meter, alat untuk mengukur kadar karbon monoksida.
- (4) Perlengkapan penyiapan preparat sampel.
- (5) Sonde, alat untuk memberikan dosis antioksidan.
- (6) Perlengkapan membuat gel.
- (7) Perlengkapan *Elektroforesis*.



Gambar 3.2 *Electrophoresis*

2) Bahan

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut.

1. Ekstrak daun *Moringa oleifera*.
2. Bubuk *Carboxymethylcellulose* (CMC).
3. Bahan pembuatan sampel penelitian jaringan paru-paru.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

4. Bahan pembuatan gel yang akan digunakan dalam *electrophoresis*.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

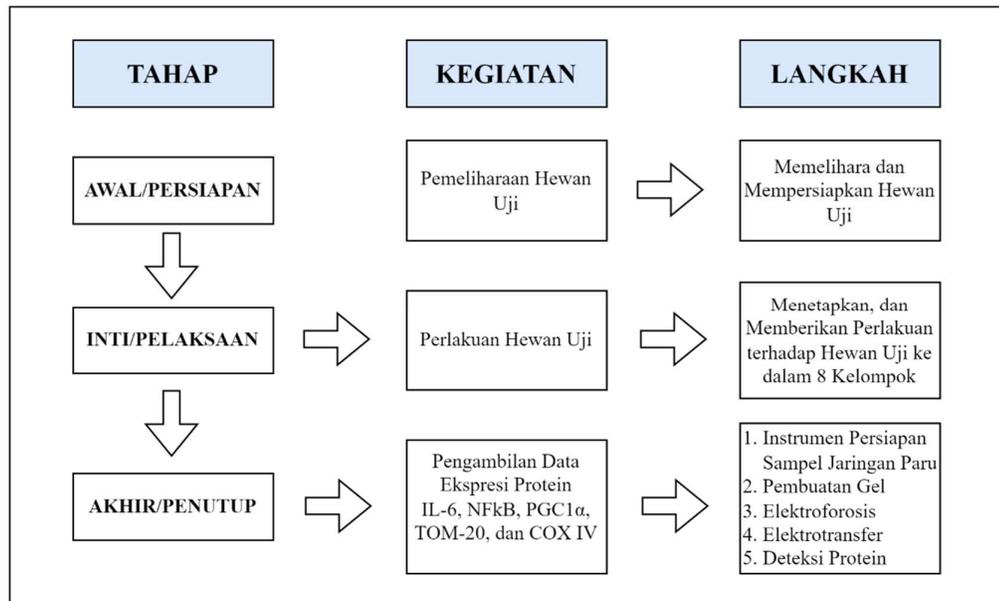
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

| perpustakaan.upi.edu

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Prosedur Eksperimen

Secara garis besar, gambaran prosedur eksperimen terbagi ke dalam tiga tahap yakni tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap penutup. Pada masing-masing tahap terdapat kegiatan dengan langkah sebagai berikut.



Gambar 3.2 Prosedur Penelitian

Penjelasan lebih lanjut mengenai alur penelitian dikemukakan pada tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1
Penjelasan Prosedur Penelitian

Tahap	Kegiatan	Langkah
Awal	Pemeliharaan Hewan Uji	1. Membagi hewan uji ke dalam 8 kelompok. Masing-masing kelompok beranggotakan 5 ekor hewan uji.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tabel 3.1
Penjelasan Prosedur Penelitian

Tahap	Kegiatan	Langkah
		<ol style="list-style-type: none"> 2. Menempatkan hewan uji yang sudah terbagi ke dalam 8 kelompok dalam kandang masing-masing berupa kontainer berukuran 70 x 50 x 55 cm. Setiap kandang diberi <i>bedding</i> sekam setebal 2 cm. 3. Pencahayaan kandang diberikan selama 12 jam. 4. Penggantian sekam dilakukan selama dua hari sekali. 5. Hewan uji diberi makanan berupa <i>pellet</i> standar dan minuman <i>ad libitum</i> tanpa batas. 6. Adaptasi hewan uji terhadap kandang dilakukan selama 1 minggu 7. Selama dua minggu, adaptasi terhadap aktivitas dilakukan dengan meningkatkan intensitas aktivitas secara bertahap.
Inti	Perlakuan Hewan Uji	Selama perlakuan, hewan uji ditempatkan pada kandang sesuai dengan tahap persiapan. Perlakuan dan pembagian kelompok hewan uji sebagaimana dipaparkan pada Tabel 3.2

Tabel 3.1
Penjelasan Prosedur Penelitian

Tahap	Kegiatan	Langkah
Akhir	Pengambilan data ekspresi protein IL-6, NFκB, PGC-1α, TOM20 dan COX IV	<ol style="list-style-type: none"> 1. Subjek penelitian dimasukkan ke dalam <i>container</i>/toples berukuran sedang. 2. Masukkan kapas yang telah diberi <i>kloroform</i> cair untuk membuat subjek pingsan. 3. Masukkan subjek penelitian ke dalam toples yang telah diisi dengan <i>kloroform</i>, kemudian tutup toples dengan rapat. 4. Tunggu 10 menit untuk meyakinkan bahwa tikus telah pingsan. 5. Setelah subjek penelitian pingsan, angkat dan kemudian letakkan dalam posisi terlentang di meja bedah. 6. Buka bagian dada tikus dan keluarkan organ paru-parunya dengan segera. 7. Organ paru-paru subjek yang telah diangkat, kemudian dicuci dengan menggunakan larutan NaCl Fisiologis hingga bersih. 8. Keringkan organ paru-paru yang telah bersih dengan menggunakan kertas saring.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tabel 3.1
Penjelasan Prosedur Penelitian

Tahap	Kegiatan	Langkah
		9. Setelah kering, paru-paru dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium dan rendam di dalam cairan nitrogen, dan dibuat penanda identitas organ dengan menggunakan spidol. 10. Sampel organ dimasukkan ke dalam <i>freezer</i> dengan suhu -80°C .

Perlakuan dan pembagian kelompok hewan uji sebanyak 40 ekor dibagi ke dalam delapan kelompok, dipaparkan secara rinci pada tabel 3.2 berikut ini.

Tabel 3.2
Pembagian Kelompok Subjek Penelitian

Nomor	Kelompok	Jenis Perlakuan
1	Kelompok A	Tanpa aktivitas. Pada kelompok ini tidak diberikan pemberian perlakuan.
2	Kelompok B	Tanpa aktivitas + pemberian <i>Moringa</i> . Pada kelompok ini hewan coba hanya diberikan ekstrak <i>Moringa oleifera</i> . pemberian dilakukan dengan dosis 200 mg/kgBB tikus perhari. Pemberian <i>Moringa</i> dilakukan dengan menggunakan sonde. Total waktu pemberian <i>Moringa</i> berjumlah 28 hari.
3	Kelompok C	Tanpa aktivitas + polusi. Pada kelompok ini hewan uji diberikan paparan polusi berupa asap kendaraan bermotor dan pembakaran sampah organik selama 30 menit. Parameter polutan yang diukur adalah PM _{2.5} , PM ₁₀ dan Karbon Monoksida (CO). Total pemaparan terhadap polusi berjumlah 28 hari.
4	Kelompok D	Tanpa aktivitas + pemberian <i>Moringa</i> + polusi. Pada kelompok ini hewan uji diberikan ekstrak <i>Moringa oleifera</i> dengan dosis 200 mg/kgBB tikus perhari, Pemberian <i>Moringa</i> dilakukan dengan menggunakan sonde. Selain itu hewan uji diberikan paparan polusi berupa asap kendaraan bermotor dan pembakaran sampah organik selama 30 menit. Parameter polutan yang diukur adalah PM _{2.5} PM _{2.5} , PM ₁₀ PM ₁₀ dan Karbon Monoksida (CO). Total pemberian <i>Moringa oleifera</i> dan polusi berjumlah 28 hari.
5	Kelompok E	Aktivitas. Pada kelompok ini hewan uji yang diberi perlakuan aktivitas fisik. Semua hewan uji melakukan aktivitas berupa berlari di atas <i>treadmill</i>

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tabel 3.2
Pembagian Kelompok Subjek Penelitian

Nomor	Kelompok	Jenis Perlakuan
		tikus dengan intensitas sedang atau kecepatan 20 meter/menit selama 30 menit yang dibagi menjadi 3 sesi masing-masing berdurasi 10 menit. Interval setiap sesi adalah 5 menit. Pemberian aktivitas fisik dilakukan selama 5 hari dengan total pemberian perlakuan berjumlah 28 hari.
6	Kelompok F	Aktivitas + polusi. Pada kelompok ini hewan uji diberi perlakuan aktivitas berupa berlari di atas <i>treadmill</i> tikus dengan intensitas sedang atau kecepatan 20 meter/menit selama 30 menit yang dibagi menjadi 3 sesi masing-masing berdurasi 10 menit. Interval setiap sesi adalah 5 menit. Pemberian Aktivitas dilakukan selama 5 hari perminggu. Selain itu hewan uji diberikan paparan polusi berupa asap kendaraan bermotor dan pembakaran sampah organik selama 30 menit. Parameter polutan yang diukur adalah PM _{2.5} , PM ₁₀ dan Karbon Monoksida (CO). Total pemberian aktivitas fisik dan polusi berjumlah 28 hari.
7	Kelompok G	Aktivitas + pemberian <i>Moringa</i> . Pada kelompok ini hewan uji diberi perlakuan aktivitas berupa berlari di atas <i>treadmill</i> tikus dengan intensitas sedang atau kecepatan 20 meter/menit selama 30 menit yang dibagi menjadi 3 sesi masing-masing berdurasi 10 menit. Interval setiap sesi adalah 5 menit. Pemberian aktivitas dilakukan selama 5 hari per minggu. Selain itu hewan uji diberikan ekstrak <i>Moringa oleifera</i> dengan dosis 200 mg/kg/BB tikus perhari, satu jam sebelum latihan. Pemberian <i>Moringa</i> dilakukan dengan menggunakan sonde. Total waktu pemberian aktivitas fisik dan <i>Moringa</i> berjumlah 28 hari.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tabel 3.2
Pembagian Kelompok Subjek Penelitian

Nomor	Kelompok	Jenis Perlakuan
8	Kelompok H	<p>Aktivitas + polusi + <i>Moringa</i>. Pada kelompok ini hewan uji diberi perlakuan aktivitas fisik berupa berlari di atas <i>treadmill</i> tikus dengan intensitas sedang atau kecepatan 20 meter/menit selama 30 menit yang dibagi menjadi 3 sesi masing-masing berdurasi 10 menit. Interval setiap sesi adalah 5 menit. Pemberian aktivitas dilakukan selama 5 hari per minggu. Selain itu hewan uji diberikan ekstrak <i>Moringa oleifera</i> dengan dosis 200 mg/kg/BB tikus perhari, satu jam sebelum latihan. Pemberian <i>Moringa</i> dilakukan dengan menggunakan sonde. Pada hewan uji juga diberikan paparan polusi berupa asap kendaraan bermotor dan pembakaran sampah organik selama 30 menit. Parameter polutan yang diukur adalah PM_{2.5}, PM₁₀ dan Karbon Monoksida (CO). Selain itu hewan uji diberikan ekstrak <i>Moringa oleifera</i> dengan dosis 200 mg/kg/BB tikus perhari, satu jam sebelum latihan. Pemberian <i>Moringa</i> dilakukan dengan menggunakan sonde. Total waktu pemberian aktivitas fisik dan <i>Moringa oleifera</i> berjumlah 28 hari.</p>

Penimbangan berat badan dilakukan pada setiap hewan uji untuk memantau asupan gizi dan mengatur dosis ekstrak daun *Moringa oleifera*. Untuk membuat sediaan ekstrak *Moringa*, pertama-tama campurkan bubuk CMC dengan air panas; kedua, setelah bubuk CMC larut, masukkan bubuk ekstrak daun *Moringa oleifera*; dan ketiga, aduk terus hingga campuran rata.

Ekspresi protein *interleukin-6* (IL-6), *Nuclear Factor Kappa B* (NFκB), *peroxisome-proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 alpha* (PGC-1α), *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20* (TOM20), dan *Cytochrome c oxidase* (COX) IV diambil dalam empat langkah, sebagai berikut.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

1) Instrumen Persiapan Sampel Jaringan Paru-paru

Proses pembuatan sampel adalah sebagai berikut: Solution A terdiri dari 250 mM sukrosa, 5 mM natrium azide (NaN_3), 2 mM etilen glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-Na pada pH 7,4; larutan C terdiri dari 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 μM Tris pada pH 7,4; 100 μM *phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF), 10 μM Leupeptin, dan 1 μM Pepstatin A.

Berikut adalah prosedur pembuatan sampel jaringan paru-paru.

- (1) Membuat larutan penyangga atau buffer yang berisi Solution A + 10 ml/ml PMSF + 1 ml/ml leupeptin + 1 ml/ml pepstatin A.
- (2) Menyiapkan blok es sebagai alas.
- (3) Menempelkan kertas parafin di atas blok es.
- (4) Memotong sampel jaringan paru-paru dari hasil perolehan subjek (disimpan pada suhu -80°C .) Sebesar 100 sampai dengan 250 mg.
- (5) Dipotong menjadi potongan yang lebih kecil kemudian dimasukkan ke dalam *potter* dan selanjutnya ditambahkan *solution* yang sudah disiapkan sebelumnya (pada point 1) dengan yang sudah diencerkan 20 kali. Contoh: apabila jaringan paru-paru 100 mg, dengan demikian larutan penyangga yang diperlukan adalah 1900 ml.
- (6) Homogenasikan sampel paru-paru dengan *homogenate* dengan menggunakan kecepatan 1000 rpm serta pada suhu 4°C (dalam es) selama 3 menit.
- (7) Mengumpulkan *supernatan* hasil *homogenate* dalam *tube*.
- (8) Memberi label pada penutup tabung.

2) Membuat Gel

Selanjutnya adalah membuat *gel* untuk proses elektroforesis. Prosedur membuat gel yang baik adalah sebagai berikut:

- (1) Menyediakan lokasi kerja. Desinfeksi tempat kerja dengan menggunakan alkohol 70% dan keringkan seluruh permukaan area lokasi kerja yang akan

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

digunakan dengan menggunakan tisu. Hamparkan selebar plastik pembungkus dan rekatkan dengan menggunakan dengan perekat. Kemudian hamparkan *brown towel* di atasnya.

- (2) Menyiapkan seluruh peralatan yang dibutuhkan seperti; *casting stand, casting frame, glass plate sandwich, plastic comb, pipette, pipette tips*. Bersihkan seluruh peralatan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%.
- (3) Menyiapkan seluruh larutan yang telah dibuat sebelumnya seperti 1M Tris HCl (pH 8,6), 10% SDS, 30% Acrylamide, 10% APS, dan Milli-Q (dw).
- (4) Memasang *glass plate sandwich* pada *casting frame*, kemudian atur bagian permukaannya dengan rata dan selanjutnya *casting frame* dikunci secara hati-hati.
- (5) Menempatkan *spoon* abu-abu di bagian bawah *casting stand*, dan tempatkan plastik parafilm di atasnya. Selanjutnya *casting frame* dipasang pada *casting stand* yang tersedia..
- (6) Upayakan bahwa tidak terdapat kebocoran pada *casting frame* yang telah dipasang, dengan menambahkan larutan Milli-Q dan biarkan selama beberapa menit. Apabila tidak terdapat kebocoran, larutan Milli-Q dibuang dan kemudian dikeringkan menggunakan kertas saring. *Casting frame* siap untuk digunakan dalam membuat gel.
- (7) Selanjutnya adalah menyiapkan *lower/running gel* yang sesuai dengan kekentalan *gel* yang diinginkan yang menyesuaikan dengan berat molekul protein yang ingin dideteksi.

Tabel 3.3 menggambarkan bahan-bahan yang digunakan untuk membuat larutan *running gel*.

Tabel 3.3
Bahan Pembuatan *Running Gel*

No	Substrat	Volume	Satuan
1	100% Milli-Q	2,037	mL

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

2	1M Tris HCl (pH 8,6 at RT)	3,9375	mL
3	10% SDS	105	μ L
4	30% Acrylamide	4,375	mL
5	10% APS	35	μ L
6	100% TEMED	10	μ L

- (1) Campurkan semua *reagent* di atas secara berurutan, ke dalam tabung ukuran 15 mL yang ditaruh di atas es. Buatlah campuran menjadi merata dengan menggunakan pipet untuk reagen yang volumenya kecil agar dapat memastikan campuran sudah tepat dan homogen..
- (2) Setelah larutan dicampur dengan 100% TEMED, masukkan dengan segera *lower/running gel* ke dalam *cassette/glass plate sandwich* dengan menggunakan pipet. Pastikan agar tidak terdapat gelembung udara pada *gel*. Selanjutnya, larutan gel dimasukkan sampai batas indikatornya. Disarankan untuk menambahkan Butanol atau Milli-Q di atas larutan *running gel* untuk mencegah timbulnya gelembung udara, kemudian dibiarkan selama 30 hingga 60 menit.

Resep membuat *running gel* dengan berbagai konsentrasi yang berbeda adalah sebagai berikut:

- (1) *Gel* terbentuk apabila nampak 3 garis sejajar pada bagian atas larutan *running gel*. Buang larutan Butanol di atasnya apabila gel telah terbentuk, kemudian bilas dengan Milli-Q (dw) sebanyak 3 kali. Selanjutnya keringkan dengan kertas saring.
- (2) Menyiapkan larutan *upper/ stacking gel* 12,5%, dengan bahan-bahan sebagaimana pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4

Bahan Pembuatan *Upper Stacking Gel*

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

No	Substrat	Volume	Satuan
1	0,5 M Tris HCL pH 6,8	1,125	mL
2	10% SDS	45	μ L
3	30% Acrylamide	0,7125	mL
4	10% APS	15	μ L
5	100% mili-Q	2,6025	mL
6	100% TEMED	9	μ L (diberikan terakhir)

- (1) Simpan *plastic comb* pada *stacking gel* setelah menuangkan larutan *upper/stacking gel* di atas *running gel*, kemudian dibiarkan pada rentang waktu 30 sampai dengan 60 menit.
- (2) Apabila gel telah terbentuk, selanjutnya dapat melakukan proses elektroforesis. Gel dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C dengan cara dibungkus dengan *brown towel* yang telah dibasahi dengan Milli-Q disemprot menggunakan alkohol 70% dan selanjutnya dibungkus kembali dengan menggunakan pembungkus plastik.

3) *Electroforesis*

Pada tahap ketiga proses penyiapan adalah memisahkan protein yang diinginkan dari sampel secara elektroforesis. Elektroforesis adalah cara memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul melalui pemberian tegangan listrik. Prosedur melakukan elektroforesis adalah sebagai berikut:

- (1) Menyiapkan lokasi kerja, kemudian dilakukan pembersihan dengan menggunakan alkohol 70% dan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan tisu. Kemudian, hamparkan selambar plastik pembungkus dan rekatkan dengan menggunakan perekat. Selanjutnya hamparkan *brown towel* di atasnya.
- (2) Siapkan alat untuk elektroforesis bila hanya 1 *gel* pilih yang ada besi ke atas.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

- (3) Tambahkan *washing buffer* sampai tanda = 2 *gel* =, kemudian isi larutan di tengah *gel* dengan larutan *washing buffer*. *Washing buffer* = 60mL + 540mL Milli-Q.
- (4) Ambil sampel dan protein *marker* (Multi Code Dyna III). (APS α Y)
- (5) Masukkan *marker* ke dalam *gel line* sebanyak 5 μ L.
- (6) Masukkan 5 μ L atau sejumlah sampel yang diinginkan ke dalam *line*.
- (7) Tutup mesin *elektroforesis* setelah seluruh sampel dimasukkan kemudian sambungkan soket sesuai dengan kutub listriknya.
- (8) Tetapkan besarnya arus listrik = 10mA (untuk 1 gel), tegangan listrik maksimal selama di *stacking gel* dalam rentang waktu 20 hingga 30 menit.
- (9) Tingkatkan arus listrik menjadi 20 mA selama 30 - 45 menit bila sampel telah mencapai *running gel*.
- (10) Matikan mesin elektroforesis apabila pita (*band*) berada di bawah *running gel*.

4) *Electrotransfer*

Tahap keempat dalam *Western Blot* adalah memindahkan protein dari gel poliakrilamid ke gel transfer menggunakan arus listrik sebagai faktor pendorong yang dinamakan elektrotransfer. Terdapat dua metode elektrotansfer, yaitu *blocking* semi kering dan *blocking* basah (Bollag et al., 1996). Dalam prosedur *Western Blot*, proses ini merupakan tahap yang sangat penting.

Langkah berikutnya adalah melakukan transfer *gel* ke *membran*, dengan prosedur sebagai berikut.

- (1) Menyiapkan larutan transfer bersamaan waktunya dengan berjalannya proses elektroforesis.
- (2) Menyiapkan membran PVDF dan kertas saring.
 - a. Ambillah *membran* menggunakan pinset, masukkan *membran* ke methanol selama 5 menit, dan pindahkan ke solution B sambil digoyang selama 30 menit.

- b. Kertas putih diambil sejumlah 3 lembar kemudian direndam selama 5 menit ke dalam larutan C.
 - c. Kertas putih diambil sejumlah 1 lembar kemudian direndam selama 5 menit ke dalam larutan B.
 - d. Selanjutnya kertas putih diambil sebanyak 2 lembar kemudian direndam selama 5 menit ke dalam larutan A.
- (3) Apabila elektroforesis telah selesai dilakukan, proses selanjutnya adalah pemindahan protein dengan menggunakan mesin *blotting*. Sandwich paper diatur sedemikian rupa mirip dengan proses menghindari timbulnya gelembung udara pada *sandwich*.
 - (4) *Western blotting* dikerjakan melalui pengaturan tegangan listrik maksimum, dan arus listrik 77 mA untuk setiap gel dalam waktu 45 menit.
 - (5) Setelah protein dipindahkan, selanjutnya *band protein* dan *loading control* dipisahkan dengan cara dipotong dengan menggunakan gunting, berdasarkan berat molekul setiap protein yang dideteksi. Hal ini dilakukan dengan menyesuaikan letaknya dengan melihat indikator *marker* yang digunakan.
 - (6) Membran dibilas sebanyak 3 kali menggunakan TBS-T sambil digoyang selama 5 menit.
 - (7) Selanjutnya membran diblok dengan menggunakan *blocking buffer* yang terbuat dari skim milk selama 60 menit pada suhu ruangan sambil digoyang. Skim milk 5% dibuat dengan cara melarutkan 5 gr skim milk dalam 100 mL TBS-T.
 - (8) Selanjutnya membran dicuci dengan TBS-T yang dilakukan sebanyak 3 kali selama 10 menit.
 - (9) Membran kemudian diinkubasi menggunakan antibodi primer dalam waktu 12 jam sambil digoyang pada suhu 4°C. Tingkat pengenceran antibodi primer adalah 500~10000 kali.

5) Deteksi Protein

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tahap kelima dari proses *Western Blot* adalah mendeteksi protein yang telah dipindahkan ke membran transfer dengan menggunakan interaksi antara antigen dan antibodi spesifik.

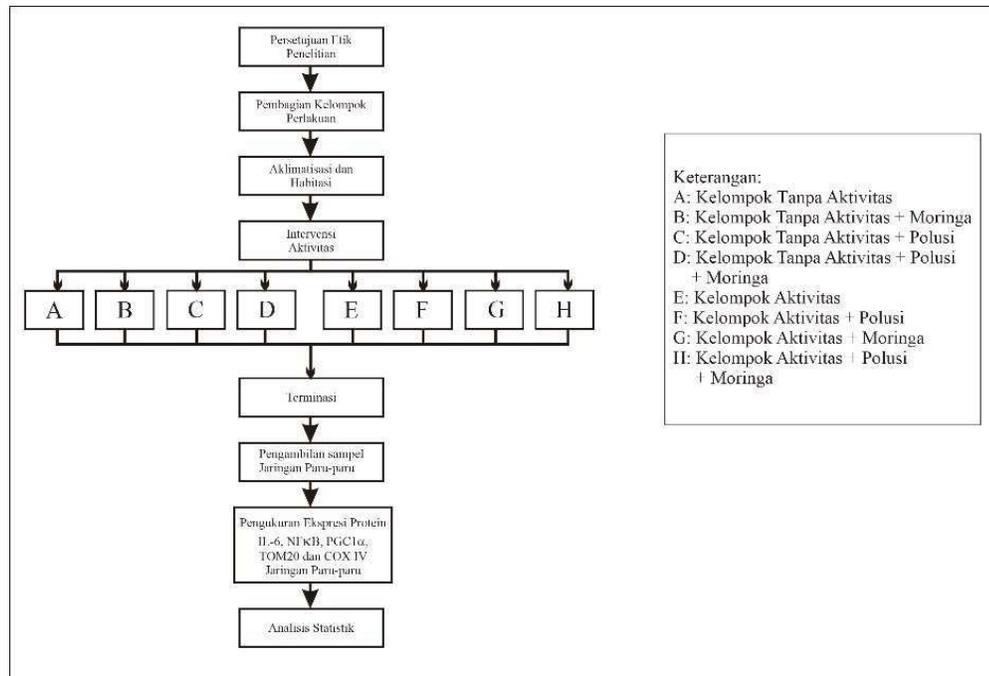
Prosedur melakukan deteksi protein yang perlu diperhatikan adalah sebagai berikut.

- (1) Mencuci membran yang telah diinkubasi selama 12 jam dengan antibodi primer menggunakan TBS-T sebanyak 3 kali 10 menit.
- (2) Menyiapkan antibodi sekunder dengan melakukan pengenceran antibodi sekunder: x 20000 Dilution buffer: 5% BSA atau 5% *skim milk* dalam TBST. Pastikan menggunakan antibodi sekunder yang spesifik untuk *anti-rabbit* atau *anti-mouse* berdasarkan pada informasi produk yang digunakan.
- (3) Menambahkan antibodi sekunder yang spesifik pada setiap membran kemudian diinkubasikan selama 60 menit dalam suhu ruangan. Selanjutnya membran dicuci dengan menggunakan TBS-T sejumlah 3 kali selama 10 menit.
- (4) Menyiapkan larutan pewarna (Amersham ECL series) dengan jumlah yang disesuaikan dengan ukuran membrane. Larutan yang digunakan berjumlah antara 500 – 600 μL pada membran berukuran besar. Apabila membran berukuran lebih kecil, larutan pewarna yang digunakan berjumlah 300 – 400 μL .
- (5) Mengambil membran dengan menggunakan pinset kemudian memasukkannya dalam larutan pewarna yang telah disiapkan pada plastik. Penempatan pewarna pada plastik yang telah dibersihkan dengan alkohol. Selanjutnya didiamkan selama 5 menit.
- (6) Mengambil membran dan menyimpannya dalam plastik yang telah disiapkan dengan menggunakan pinset sesuai ukuran membran. Permukaan plastik dibersihkan agar tidak terbentuk gelembung udara dan kelebihan larutan..
- (7) Menyalakan alat *Microchemi* dengan menekan tombol ON yang ada di belakang dan di depan alat sebelum komputer dinyalakan.

- (8) Membuka program dengan mengklik dua kali pada “Gel Capture” dan menunggu selama 15 hingga 30 menit sebelum siap untuk digunakan.
- (9) Menempatkan sampel pada alat Microchemi, selanjutnya pilih "Auto" kemudian "Start" dan tunggu mesin bekerja.
- (10) Pada jendela yang muncul, pilih “Quantity” untuk mendeteksi sinyal pada membran, kemudian lanjutkan dengan klik “OK”.
- (11) Menyimpan data setelah sinyal protein yang dibaca muncul. Pilih “File”, kemudian “Save Image”. Penamaan file dilakukan dengan menyesuaikan tanggal penyimpanan data dan nama protein.
- (12) Membuka data dengan klik kembali “File” dan “Save with reference”. Setelah itu, untuk menghidupkan lampu, tekan tombol “light” yang ada di microchemi, selanjutnya klik “OK”. Setelah itu, sesuaikan pencahayaan untuk mendeteksi band-nya marker agar terlihat baik. Jika sudah melihat marker dengan jelas, klik “Copy Invert”. Jika hasil gambarnya baik dan dirasa cukup, lanjutkan dengan klik “Done”.
- (13) Mematikan lampu dan klik “OK”.
- (14) Selanjutnya mengeluarkan sampel membran dari dalam Microchemi.
- (15) Mematikan Microchemi dan komputer. Salin file hasil deteksi protein pada tempat penyimpanan data (seperti flashdisk). Untuk analisis selanjutnya dilakukan dengan “imageJ”.

3.5.2 Alur Penelitian

Alur penelitian dari awal hingga akhir digambarkan sebagai berikut.



Gambar 3.3 Alur Penelitian

3.6 Analisis Data

Analisis data untuk menjawab enam pertanyaan penelitian menggunakan teknik MANOVA (Analisis Varians Multivariat), dengan rumus sebagai berikut.

$$\Lambda = \frac{|W|}{|T|} = \frac{|W|}{|W + B|}$$

$$T = \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})(X_{ij} - \bar{X})'$$

$$W = \sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)(X_{ij} - \bar{X}_i)'$$

$$B = \sum_{i=1}^g n_i (\bar{X}_i - \bar{X})(\bar{X}_i - \bar{X})'$$

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024

**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
 DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
 DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Lebih rinci, penggunaan MANOVA pada setiap pertanyaan penelitian dijelaskan pada Tabel 3.5 di bawah ini.

Tabel 3.5
Analisis Data

No	Pertanyaan	Analisis Data
1	Apakah aktivitas di ruang terbuka berpengaruh terhadap proses inflamasi paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh Aktivitas terhadap ekspresi relatif protein IL-6 dan NFκB pada Kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H
2	Apakah aktivitas di ruang terbuka berpengaruh terhadap <i>mitochondrial biogenesis</i> paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh Aktivitas terhadap ekspresi relatif protein PGC1α, TOM20 dan COX IV pada kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H
3	Apakah pemberian ekstrak daun moringa berpengaruh terhadap proses inflamasi paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh pemberian ekstrak daun moringa terhadap ekspresi relatif protein IL-6 dan NFκB pada Kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H
4	Apakah pemberian ekstrak daun moringa berpengaruh terhadap <i>mitochondrial biogenesis</i> paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh pemberian ekstrak daun moringa terhadap ekspresi relatif protein PGC1α, TOM20 dan COX IV pada kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H
5	Apakah polusi udara berpengaruh terhadap proses inflamasi paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh polusi udara terhadap ekspresi relatif protein IL-6 dan NFκB pada Kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H

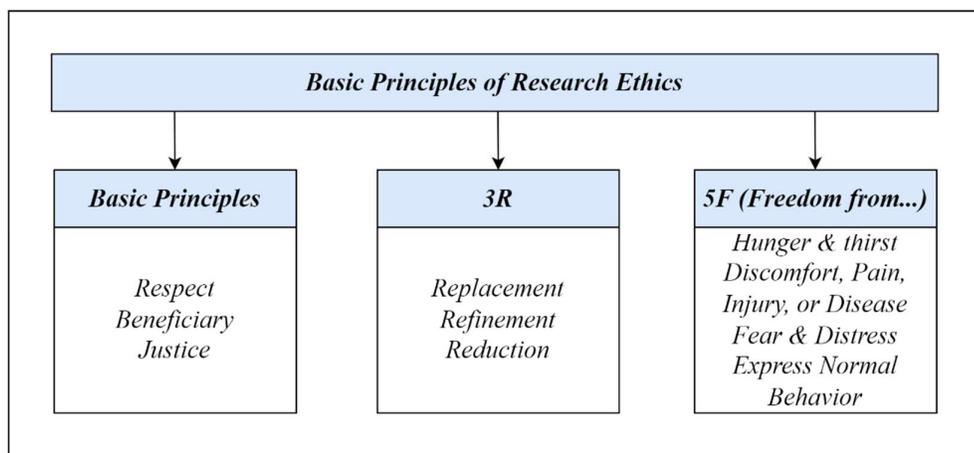
Lucky Angkawidjaja Roring, 2024
**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
 DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
 DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

Tabel 3.5
Analisis Data

No	Pertanyaan	Analisis Data
6	Apakah polusi udara berpengaruh terhadap <i>mitochondrial biogenesis</i> paru-paru?	Uji MANOVA pengaruh polusi udara terhadap ekspresi relatif protein PGC1 α , TOM20 dan COX IV pada kelompok A, B, C, D, E, F, G, dan H

3.7 Etika Penelitian

Eksperimen dalam penelitian merupakan studi *in vivo* di laboratorium yang menggunakan tikus Wistar sebagai organisme utuh/hidup normal. Dengan demikian pedoman dan etika penelitian berpegang pada *The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal*, sebagai berikut.



Gambar 3.4 Prinsip-Prinsip Dasar Etik Penelitian

Selain aturan untuk memperlakukan hewan coba secara *humane*, tiga prinsip dasar yang diperhatikan dan dipenuhi dalam penelitian menggunakan hewan coba adalah sebagai berikut.

Lucky Angkawidjaja Roring, 2024
**PERBEDAAN PENGARUH AKTIVITAS DI RUANG TERBUKA
 DAN RUANG TERBUKA BERPOLUSI SERTA PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TERHADAP INFLAMASI
 DAN MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PARU-PARU**

- 1) **Respect**, artinya menghormati hewan coba sebagai makhluk hidup/bernyawa, bukan sebagai benda mati.
- 2) **Beneficiary**, mengandung makna penelitian yang dilakukan bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain.
- 3) **Justice**, artinya bersikap adil dalam memanfaatkan hewan coba, setiap subjek mempunyai kesempatan yang sama untuk mendapat perlakuan atau tidak /dipilih secara acak.

Selanjutnya, pemenuhan prinsip 3R dalam etika riset dijelaskan sebagai berikut.

- 1) **Reduction**, dilakukan dengan menggunakan jumlah hewan minimal untuk memperoleh hasil penelitian yang kredibel. Penambahan jumlah hewan harus memiliki alasan yang rasional.
- 2) **Replacement** dilakukan melalui penggunaan sel, jaringan atau organ hewan yang telah diterminasi secara manusiawi. Alternatif lain adalah tidak menggunakan subjek penelitian berupa hewan.
- 3) **Refinement** dilakukan dengan cara meminimalisasi penderitaan hewan coba dengan cara menghilangkan atau mengurangi rasa nyeri demi kesejahteraan hewan coba.