

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan *true eksperimental*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Rancangan ini memungkinkan peneliti untuk mengukur pengaruh perlakuan pada tikus percobaan yang telah dirandomisasi dengan cara membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol.

### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

#### 4.2.1 Populasi Penelitian

Objek penelitian menggunakan hewan coba yaitu tikus jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

##### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jenis *Rattus Novergicus Strain wistar*
- Jenis kelamin jantan
- Berusia 6-8 minggu
- Berat badan 140-250 gram
- Dalam keadaan sehat selama penelitian dan tidak mendapat pengobatan sebelumnya

##### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus tidak mau makan selama penelitian
- Tikus mati saat penelitian

### 4.2.3 Estimasi Besar Sampel

Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok eksperimen. Kelompok kontrol terdiri dari satu kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok dan satu kelompok tikus lainnya dipapar asap rokok. Sedangkan kelompok eksperimen terdiri dari 3 kelompok tikus yang akan dipapar asap rokok dan diberi tepung daun ubi jalar ungu dengan dosis yang berbeda untuk masing-masing kelompok.

Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian didapatkan dari perhitungan estimasi sampel menggunakan rumus Federer (Hanafiah, 2008) sebagai berikut:

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

Dimana:

n = jumlah pengulangan/besar sampel dalam kelompok

t = jumlah perlakuan/banyaknya kelompok (5 kelompok)

15 = nilai deviasi

Maka jumlah sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah :

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

$$[(5 - 1)(n - 1)] \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4.75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Dari hasil perhitungan rumus diatas, didapatkan jumlah sampel minimal untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah 5 ekor

sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan minimal sebanyak 5 x 5 ekor tikus = 25 ekor tikus. Untuk mengurangi *lose of sample* ditengah penelitian maka jumlah sampel ditambah 1 ekor tikus untuk setiap kelompok. Jadi untuk total secara keseluruhan dibutuhkan 30 ekor tikus *Rattus Novergicus Strain Wistar*.

#### 4.2.4 Randomisasi dan Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Posttest Only Control Group Design* (Maulida Rachmani, 2011). Setiap tikus percobaan memiliki probabilitas yang sama untuk mendapat perlakuan.

Dalam penelitian ini tikus akan dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (K(-)), kontrol positif (K(+)), perlakuan 1 (P 1) , perlakuan 2 (P 2), dan perlakuan 3 (P 3).

Teknik randomisasi dan desain penelitian dilakukan dengan langkah sebagai berikut :

1. Berikan nomor urut 1-30 pada sampel
2. Ambil bilangan random sebanyak sampel dengan menggunakan angka acak
3. Beri rangking pada bilangan random yang diperoleh. Tabel randomisasi dapat dilihat pada tabel di bawah ini

Tabel 4.1 Randomisasi Tikus Percobaan

No.	Bilangan Acak	Peringkat	Kelompok Perlakuan
1	754	27	K(-)
2	537	17	
3	243	6	
4	791	28	
5	581	19	
6	728	25	
7	300	7	K(+)
8	104	1	
9	191	3	
10	798	29	
11	567	18	
12	490	14	
13	414	11	P1
14	836	30	
15	426	12	
16	738	26	
17	319	8	
18	631	21	
19	601	20	P2
20	153	2	
21	358	10	
22	518	16	
23	493	15	
24	198	4	
25	690	23	P3
26	639	22	
27	224	5	
28	453	13	
29	322	9	
30	711	24	

Keterangan :

K (-) : kelompok kontrol negatif

K (+) : kelompok kontrol positif

P 1 : kelompok perlakuan 1

Dengan demikian hasil randomisasi menunjukkan kelompok kontrol negatif (K(-)) terdiri dari peringat 27,17,6,28,19,25; kelompok kontrol positif (K(+)) terdiri dari peringat 7,1,3,29,18,14; kelompok perlakuan (P1) terdiri dari peringat 11,30,12,26,8, 21; kelompok perlakuan (P2) terdiri dari peringat 20, 2,10,16,15,4; kelompok perlakuan (P3) terdiri dari peringat 23,22,5,13,9, 24.

4. Kemudian masukkan jenis perlakuan dalam sampel pada rancangan penelitian sebagaimana disajikan pada tabel berikut:

**Tabel 4.2 Desain Layout Penelitian**

1	K+	2	P2	3	K+	4	P2	5	P3	6	K-
7	K+	8	P1	9	P3	10	P2	11	P1	12	P1
13	P3	14	K+	15	P2	16	P2	17	K-	18	K+
19	K-	20	P2	21	P1	22	P3	23	P3	24	P3
25	K-	26	P1	27	K-	28	K-	29	K+	30	P1

#### 4.3 Variabel Penelitian

- a. **Variabel Tergantung** : Jumlah sel radang akut di alveoli paru tikus jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* jantan.
- b. **Variabel Bebas** : Pemberian tepung daun ubi jalar ungu

#### 4.4 Lokasi dan Waktu penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Polinema untuk pembuatan tepung daun ubi jalar ungu, Laboratorium Farmakologi untuk pemeliharaan tikus percobaan, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pengukuran jumlah sel radang akut di alveoli paru.

#### **4.4.2 Waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari-Februari 2013

#### **4.5 Bahan dan Alat Penelitian**

##### **4.5.1 Bahan**

##### **4.5.1.1 Bahan Pakan Tikus percobaan**

Penelitian ini menggunakan satu macam jenis diet yaitu pakan diet normal. Diet ini diberikan pada semua kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok eksperimen. Pemberian pakan diet normal ini disesuaikan dengan kebutuhan makan tikus dewasa per ekor yaitu, 30,5 gram dengan energi  $\pm$  104 kalori. Komposisi pakan diet normal ini terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, kalsium 1,1%, fosfor 0,9%, antibiotika, coccidiostat 53%), tepung terigu 23,5 % dan air 23,5 %.

##### **4.5.1.2 Tepung Daun Ubi jalar Ungu**

##### **4.5.1.2.1 Penentuan Dosis Tepung Daun Ubi Jalar Ungu**

Pemberian tepung daun ubi jalar ungu kepada tikus, dilakukan berdasarkan dosis yang disesuaikan dengan anjuran konsumsi polifenol pada tikus. Perhitungan yang dilakukan untuk mendapatkan anjuran konsumsi polifenol pada tikus adalah dengan perkalian silang antara kebutuhan konsumsi polifenol manusia, rata-rata berat badan manusia dewasa dan rata-rata berat badan tikus.

$$\frac{\text{kebutuhan polifenol pada manusia}}{\text{rata - rata berat badan manusia dewasa}} = \frac{\text{kebutuhan polifenol pada tikus}}{\text{rata - rata berat badan tikus}}$$

$$\frac{902 \text{ mg GAE}}{70.000 \text{ g}} = \frac{x}{200}$$

$$x = \frac{902 \times 200}{70.000}$$

$$x = 2,577 \text{ mg gallic acid equivalent (GAE)}$$

Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Negeri Jember didapatkan data bahwa dalam 100 gram tepung daun ubi jalar ungu mempunyai kadar total polifenol sebanyak 1805 mg GAE. Sehingga daun ubi jalar ungu yang digunakan untuk perlakuan adalah :

$$\frac{2,57 \text{ mg GAE}}{x} = \frac{1805 \text{ mg GAE}}{100}$$

$$x = \frac{100 \times 2,57}{1805}$$

$$x = 0,14 \text{ gram}$$

Penentuan dosis untuk perlakuan 1, 2, dan 3 dilakukan dengan pola  $1/2n$  ,  $n$  , dan  $2n$ . Sehingga dosis pemberian daun ubi jalar ungu pada perlakuan 1, 2 dan 3 adalah 0,07g ; 0,14 g; dan 0,28 g

#### 4.5.1.2.2 Kebutuhan Tepung Daun Ubi jalar Ungu

Tepung daun ubi jalar ungu yang dibutuhkan selama penelitian ini adalah sebagai berikut :

**Tabel 4.3 Kebutuhan Tepung Daun Ubi Jalar Ungu**

Kelompok	Tepung Daun Ubi jalar Ungu	
	g/ ekor	Jumlah (g)*
K (-)	Placebo	-
K (+)	Placebo	-
P1	0,07	12,6
P2	0,14	25,2
P3	0,28	50,4
Total		88,2

\*Jumlah tepung daun ubi jalar yang dibutuhkan dengan 6 ekor tikus/kelompok selama 30 hari

#### 4.5.1.3 Bahan Paparan Asap Rokok

Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek. Rokok kretek dipilih karena kandungan tar dan nikotin dalam rokok kretek lebih tinggi (Widodo, 2006). Rokok yang dipilih menggunakan merek tertentu dengan kadar nikotin sebanyak 5,31 mg dan karbon monoksida sebanyak 23 mg.

**Tabel 4.4 Perbandingan Kandungan Particulate, Nikotin, Dan Karbon Monoksida Rokok Berdasarkan Merknya**

Merk Rokok	Particulate (mg)	Nikotin* (mg)	Karbon Monoksida (mg)
Djarum	53,7	5,07	19,5
Dji Sam Soe	40,7	5,31	23,0

Gudang Garam	52,0	5,28	18,2
Wismilak	48,3	5,10	19,7
Australian Brands	17,0	1,1	14,2

\*nilai rata-rata

Puslit Penyakit Tidak Menular dan *Dept of Science and Environment Australi, 2007*

#### 4.5.1.4 Bahan untuk Pengambilan Organ

- Ketamin
- Formalin 10%

#### 4.5.1.5 Bahan untuk Pemeriksaan Histopatologi

- Sediaan paru dari tikus percobaan
- Formalin buffer 10%
- Xylol
- Counter Staining
- Entelen
- Pewarna Haris-Haematoxilen
- Alkohol asam dan larutan Ammonium
- Parafin kertas

#### 4.5.1.6 Bahan untuk Penghitungan Jumlah Sel Radang Akut

Preparat paru tikus yang dicat dengan hematoksilin-eosin (HE).

#### 4.5.2 Alat

##### 4.5.2.1 Alat Pemeliharaan Tikus Percobaan

1. Kandang dari kotak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
2. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat
3. Botol air untuk minum

4. Timbangan analitik
5. Alat untuk memantau keadaan tikus: form pemantauan harian, timbangan untuk mengukur BB tikus

#### 4.5.2.2 Alat Pembuatan Pakan Tikus

Pembuatan pakan tikus membutuhkan alat-alat berikut :

1. Sendok
2. Timbangan analitik untuk mengukur kebutuhan tepung daun ketela ungu dan diet normal
3. Baskom
4. Pengaduk

#### 4.5.2.3 Alat Untuk Pemaparan Asap Rokok

Alat yang digunakan untuk pemaparan asap rokok pada tikus adalah "*Smooking Pump*". Alat ini berupa sebuah ruangan dimana terdapat pipa untuk mengalirkan asap rokok. Bagian lainnya yaitu pompa berfungsi menghisap rokok yang bekerjanya dibantu oleh adaptor.

#### 4.5.2.4 Alat Untuk Pemberian Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Tepung daun ubi jalar ungu dicampur dengan air , lalu diberikan pada tikus melalui spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde yang bisa melewati mulut, esophagus hingga lambung.

#### 4.5.2.5 Alat untuk Pengambilan Organ

- a. Kapas yang dibasahi eter
- b. Scalpel
- c. Gunting
- d. Pinset
- e. Jarum pentul

- f. Alas kayu
- g. Spuit 2,5 ml
- h. Tabung sebagai tempat penyimpanan organ sementara sebelum dibuat preparat histologi

#### 4.5.2.6 Alat Pembuatan Sediaan Histopatologi

- Rotari Mikrotom
- Mikroskop Cahaya
- Object Glass
- Cover Glass
- Kamera untuk foto histopatologi
- Kamera digital dan software komputer yang mendukung

#### 4.6 Definisi Operasional

##### 4.6.1 Asap Rokok

Pemaparan asap rokok yang berasal dari rokok kretek dengan merk tertentu sebanyak 1 batang /hari selama 5 menit selama 30 hari (Anni Nurliani, 2012).

##### 4.6.2 Pemberian Tepung Daun Ubi Jalar Ungu

Pemberian tepung daun ubi jalar ungu yang berasal dari daun ubi jalar ungu yang ditepungkan di Laboratorium Kimia Polinema yang diberikan pada tikus melalui sonde dalam dosis I (0,07 g), dosis II (0,14 g) dan dosisi III (0,28 g).

##### 4.6.3 Sel Radang Akut di Alveoli Paru Tikus

Perhitungan jumlah sel radang di alveoli paru dilakukan dengan menghitung jumlah sel radang akut yaitu neutrofil karena basofil dan eosinofil mempunyai jumlah yang sangat sedikit. Sediaan histopatologi

dilakukan pengecatan menggunakan HE (Hematoksilin Eosin) dan jumlah sel radang dihitung menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 X pada 10 lapang pandang yang dipilih secara acak.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Perlakuan pada Tikus Percobaan

Pada tahap awal, tikus dilakukan masa adaptasi selama 7 hari yang bertujuan agar tikus dapat menyesuaikan dengan lingkungannya. Pada masa adaptasi ini, tikus diberi pakan diet normal dan ditimbang berat badannya sebelum dan sesudah masa adaptasi untuk memastikan berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan dapat digunakan untuk penelitian.

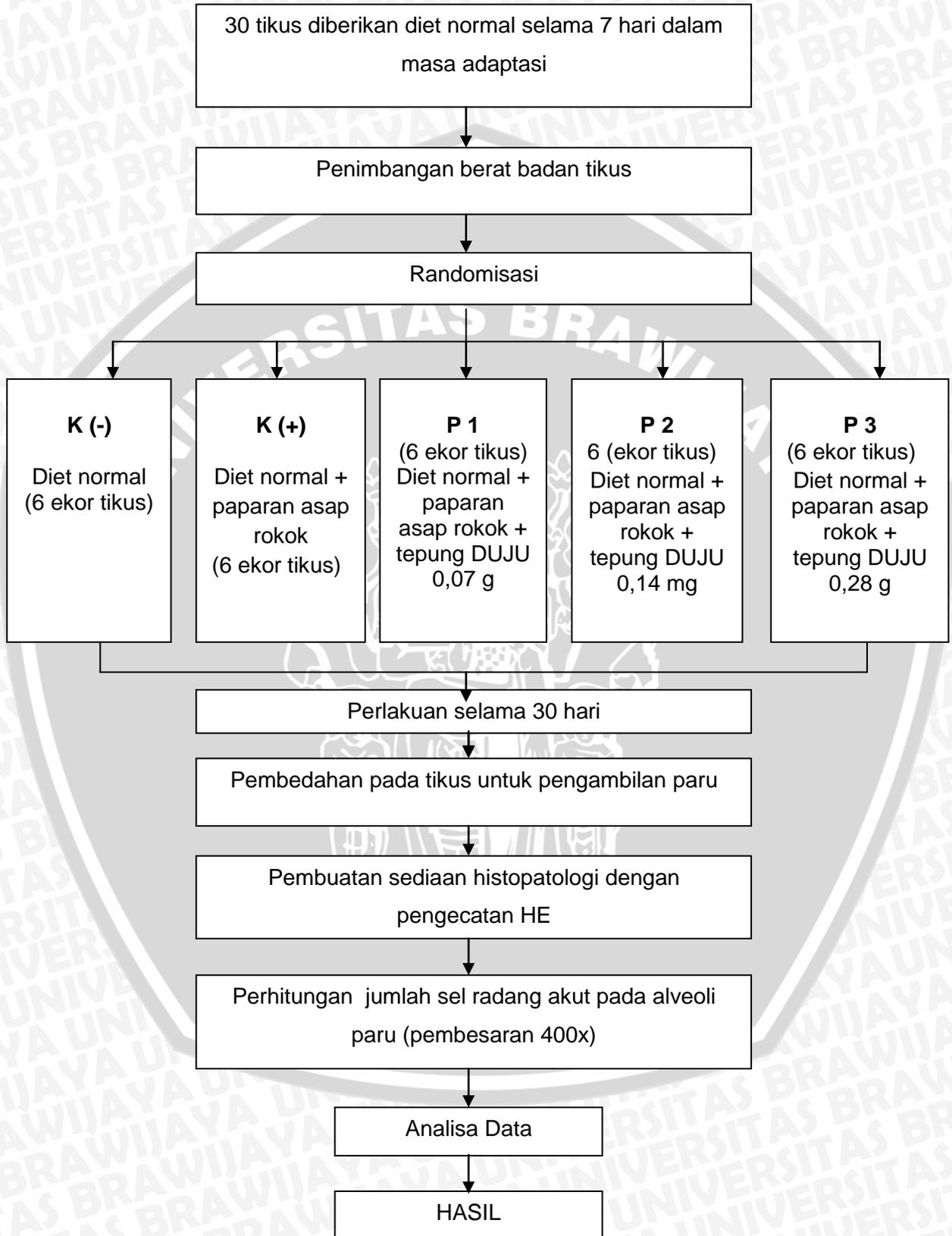
Selanjutnya tikus dirandomisasi dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok penelitian menggunakan teknik random sampling. Pembagian kelompok tikus tersebut adalah :

1. **Kelompok kontrol negatif (K(-))** adalah kelompok tikus yang hanya diberikan pakan diet normal tanpa diberikan paparan asap rokok dan tanpa pemberian tepung daun ubi jalar ungu
2. **Kelompok kontrol positif (K(+))** adalah kelompok tikus yang hanya diberikan pakan diet normal dan diberikan paparan asap rokok tanpa diberikan tepung daun ubi jalar ungu
3. **Kelompok perlakuan 1 (P 1)** adalah kelompok tikus yang diberikan pakan diet normal, paparan asap rokok dan tepung daun ubi jalar ungu sebanyak 0,07 g

4. **Kelompok perlakuan 2 (P 2)** adalah kelompok tikus yang diberikan pakan diet normal, paparan asap rokok dan tepung daun ubi jalar ungu sebanyak 0,14 g
5. **Kelompok perlakuan 3 (P 3)** adalah kelompok tikus yang diberikan pakan diet normal, paparan asap rokok dan tepung daun ubi jalar ungu sebanyak 0,28 g

Selama 30 hari, tikus diperlakukan sesuai dengan kelompok perlakuan. Diet normal dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Pemberian tepung daun ubi jalar ungu diberikan secara sonde dengan mencampurkan tepung daun ubi jalar ungu dan air terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk memastikan tikus mengkonsumsi seluruh tepung sesuai dosis yang telah ditetapkan. Untuk kelompok kontrol negatif dan kontrol positif diberikan placebo secara sonde untuk menyamakan tingkat stress akibat sonde pada semua kelompok perlakuan.

Penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan dilakukan setiap hari. Penimbangan berat bada tikus dilakukan setiap 7 hari sekali. Sedangkan pergantian sekam dalam kandang tikus dilakukan 2 kali setiap 7 hari. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada diagram alur penelitian sebagai berikut :



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

Keterangan :

K (-) : Kontrol negative

K(+) : Kontrol positif

P 1 : Kelompok perlakuan 1

P 2 : Kelompok perlakuan 2

P 3 : Kelompok perlakuan 3

DUJU : Daun Ubi Jalar Ungu

#### 4.7.2 Pemaparan dengan Asap Rokok

Pemaparan asap rokok pada tikus dilakukan dengan menggunakan asap rokok kretek dari merek tertentu yang telah ditetapkan dengan bantuan alat berupa 'smoking pump'. Smoking pump adalah alat yang terdiri dari mesin pompa dan pipa yang dapat memompakan asap rokok yang volumenya dapat diatur sesuai dengan kecepatan mesin pompa. Dosis pemaparan setiap 3 ekor tikus adalah satu batang rokok perhari selama 30 hari selama 5 menit karena pemaparan asap rokok selama 8 menit dapat menyebabkan gangguan napas (Widi, 1995).

Cara Pemaparan:

1. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap
2. Nikotin yang melekat pada klep alat smoking pump dibersihkan terlebih dahulu
3. Power dan self voltage diperiksa
4. Rokok kretek dipasang pada pipa
5. Tiga ekor tikus dimasukkan ke dalam masing-masing kotak dan segera ditutup

6. Pemaparan asap rokok dilakukan dengan cara menjalankan pompa selama 5 menit setelah itu switch dimatikan. Kemudian tutup kotak dibuka dan tikus dipindahkan ke kandang semula. Selama pemaparan asap rokok, pipa saluran dijepit dan dibuka secara manual.
7. Setiap pemaparan asap rokok berikutnya, kotak selalu dibersihkan lebih dahulu dari asap rokok sebelumnya.
8. Pompa dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap
9. Tahap-tahap diatas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya.

#### **4.7.3 Prosedur Pengambilan Organ**

Tikus yang akan dibedah dibius menggunakan kapas yang sudah ditetesi eter terlebih dahulu. Tikus dibiarkan lemas, kemudian dibedah dan diambil organ paru tikus. Potongan paru ini kemudian dimasukkan dalam larutan formalin 10 %, untuk kemudian dibuat sediaan histopatologi dengan pengecatan hematoxyclin-eosin (HE).

#### **4.7.4 Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologi**

##### **Proses Pematangan Jaringan berupa Makross**

1. Gross hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) selama 24 jam
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
3. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter
4. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses/ dimasukkan ke alat Tissue Tex Prosesor

6. Di proses menggunakan alat/mesin Tissue Tex Prosesor selama 90 menit

7. Alarm bunyi tanda selesai

### Proses Pengeblokan dan Pematangan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron

### Proses Deparafinisasi

Setelah dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, ditaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

### Proses Pengecatan Slide

#### a. Proses Pewarnaan

- |                                                |             |
|------------------------------------------------|-------------|
| 1. Cat utama <i>Harris Hematoksilin</i> selama | 10-15 Menit |
| 2. Cuci dengan air mengalir selama             | 15 Menit    |
| 3. Alkohol asam 1 %                            | 2-5 Celup   |
| 4. Amonia air                                  | 3-5 Celup   |
| 5. Cat pembanding:                             |             |
| - Eosin 1% selama                              | 10-15 Menit |

#### b. Proses Dehidrasi

- |                |         |
|----------------|---------|
| 1. Alkohol 70% | 3 menit |
| 2. Alkohol 80% | 3 menit |
| 3. Alkohol 96% | 3 menit |

4. Alkohol Absolut

3 menit

**c. Penjernihan (*Clearring*)**

1. Xylol

60 menit

2. Xylol

60 menit

3. Biarkan slide kering pada suhu ruangan

4. Setelah slide kering siap untuk diamati

**4.7.5 Prosedur Penghitungan Jumlah Sel Radang Akut di Alveoli Paru**

Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis thp 29 preparat histopatologi alveoli tikus dengan pembesaran 400x. setiap preparat dipilih 10 lapangan untuk dihitung jumlah sel radang yang tampak. Lapangan pandang dipilih secara acak dan jumlah sel radang akut dihitung dengan cara manual.

**4.8 Pengolahan dan Analisa Data**

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS 16. Seluruh data diuji dengan test of homogeneity of variances untuk mengetahui bahwa semua data homogen. Kemudian dilanjutkan uji *one way ANNOVA* yang kemudian dilakukan uji *Post Hoc Tuckey* untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah sel radang akut di alveoli paru tikus antar kelompok. Perbedaan dikatakan bermakna jika  $P < 0,05$ .