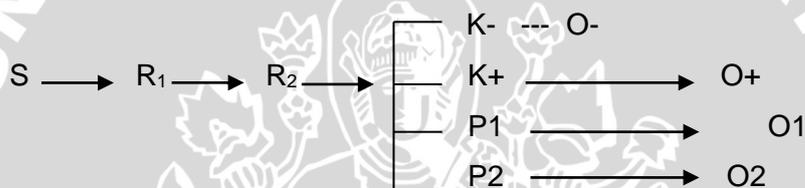


## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*, untuk mengetahui pengaruh latihan renang terhadap kadar kolesterol LDL. Menggunakan 2 kelompok kontrol, yaitu kontrol positif (K+) dan kontrol negatif (K-) serta 2 kelompok perlakuan (P1 dan P2).



Keterangan :

- S : Sampel
- R<sub>1</sub> : Randomisasi 1 (*Simple Random Sampling*)
- R<sub>2</sub> : Randomisasi 2 (*Simple Random Sampling*)
- K- : Kelompok kontrol yang tidak terpapar asap rokok dan tidak latihan renang
- K+ : Kelompok kontrol yang terpapar asap rokok, tanpa latihan renang
- P1 : Kelompok perlakuan yang terpapar asap rokok dan latihan renang intensitas ringan
- P2 : Kelompok perlakuan yang terpapar asap rokok dan latihan renang intensitas berat
- O- : Data kelompok kontrol negatif
- O+ : Data kelompok kontrol positif
- O1 : Data kelompok perlakuan 1
- O2 : Data kelompok perlakuan 2

## 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

### 4.2.1 Populasi penelitian

Adalah seluruh tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi FKUB.

### 1.2.2 Sampel penelitian

Adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipelihara di Lab. Farmakologi FKUB, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusinya adalah :

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar
- Berat tubuh 200-250 gram
- Kondisi sehat (aktif bergerak), tidak ada kelainan anatomis
- Belum pernah digunakan penelitian

Kriteria eksklusinya adalah :

- Tikus putih yang sakit selama perlakuan berlangsung
- Tikus putih yang mati

### 1.2.3 Besar Sampel penelitian

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan rumus Steell dan Torrie (1991)

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

- n = besar sampel  
Z $\alpha$  = harga standar  $\alpha$  0,05 (satu arah) = 1,65  
Z $\beta$  = harga standar  $\beta$  0,2 = 0,84  
 $\sigma$  = standar deviasi  
d = beda mean kelompok kontrol dan perlakuan

Dengan menganggap bahwa populasi berdistribusi normal dan perbedaan rata-rata antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai perbedaan (d) sebesar  $\sigma$  (1 standar deviasi) sehingga  $\sigma^2 / d^2 = 1$ , maka  $n = (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Berdasarkan perhitungan rumus tersebut maka  $n = 6,2$  sehingga besar sampel minimal yang digunakan adalah 7 ekor tikus untuk setiap kelompok sehingga sampel keseluruhan adalah 28 ekor.

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

#### 4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 15 September sampai 17 November 2014.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel bebas

1. Latihan renang

#### 4.4.2 Variabel terikat

1. Kadar kolesterol LDL darah tikus

#### 4.4.3 Variabel kendali

1. Umur hewan coba
2. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

### 4.5 Definisi Operasional

#### a. Hewan coba

Adalah binatang yang digunakan dalam penelitian yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berusia dengan berat 200-250 gram.

#### b. Paparan asap rokok

Adalah suatu proses peniupan asap rokok dengan cara menyalurkan asap rokok ke suatu ruang tertutup dengan alat *smoking pump*. Alat ini menyedot asap yang dihasilkan dari pembakaran rokok dan disalurkan dengan menggunakan selang. Metode paparan asap rokok ini menggunakan rokok kretek tanpa filter untuk menghindari hambatan masuknya nikotin dan dosis 2 batang per hari untuk 3 tikus (pagi dan sore) dalam 5 menit selama 8 minggu (Pawlak *et al.*, 2011).

#### c. Latihan renang intensitas ringan

Adalah suatu progresi sesi *exercise* renang yang dilakukan secara konsisten untuk meningkatkan fungsi fisiologis dengan beban kerja 40% dari nilai rata-rata waktu renang maksimal dan beban pemberat 3% dari berat badan. Frekuensi latihan renang 1x sehari, dilakukan

sebanyak 3x seminggu (Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 cit Athar, 1999).

d. Latihan renang intensitas berat

Adalah suatu progresi sesi *exercise* renang yang dilakukan secara konsisten untuk meningkatkan fungsi fisiologis dengan beban kerja sepertiga dari lama latihan renang intensitas ringan, dan beban pemberat 9% dari berat badan. Frekuensi latihan renang 1x sehari, dilakukan sebanyak 3x seminggu (Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 cit Athar, 1999).

e. Kadar Kolesterol LDL Darah

Adalah jumlah kolesterol yang diangkut oleh LDL dalam darah yang diukur dengan metode spektrofotometri dan dinyatakan dengan satuan mg/dl.

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Bahan

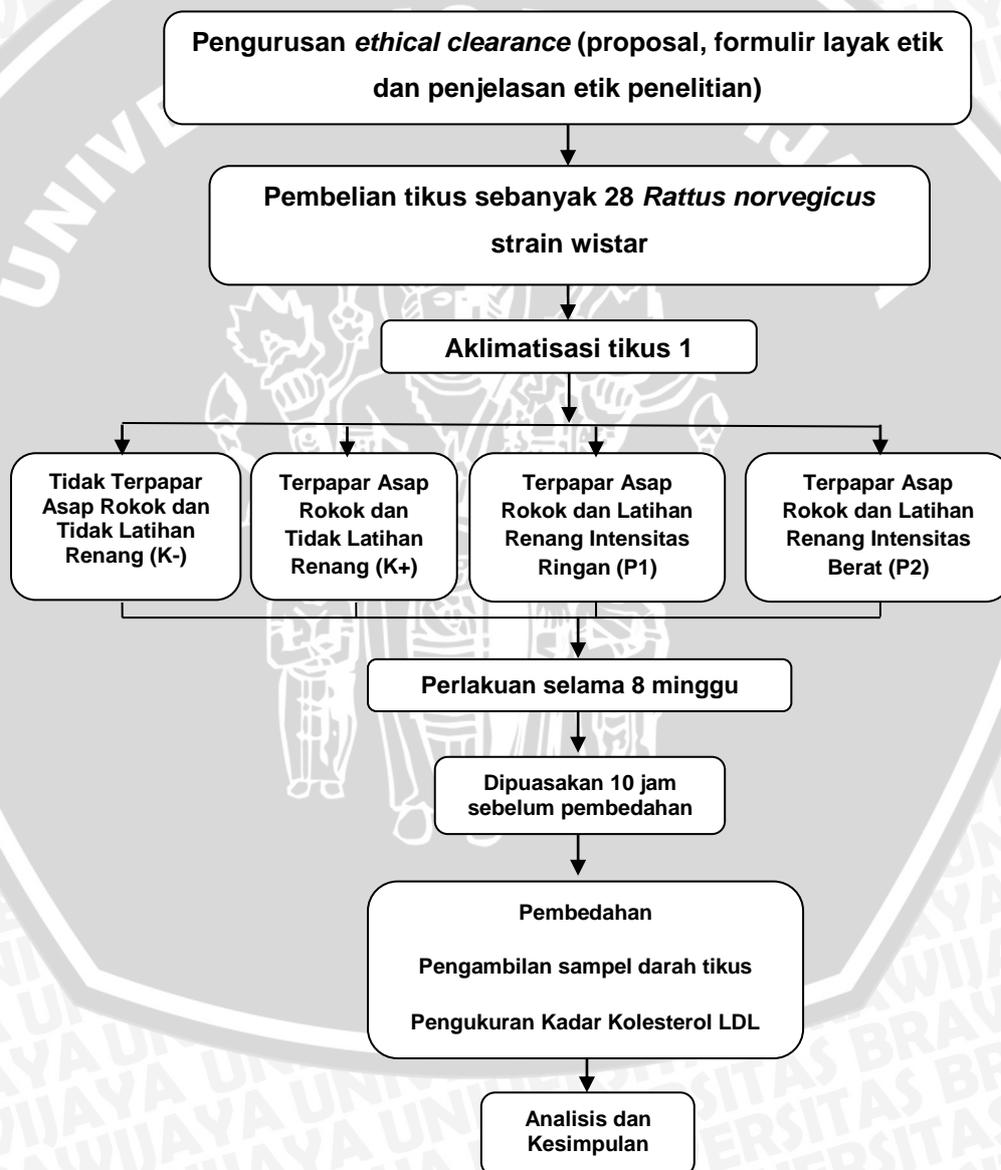
- Pakan dan minum standar tikus
- Tikus jantan galur Wistar sebagai bahan coba yang memenuhi kriteria inklusi, mendapat pakan dan minum standar
- Rokok kretek tanpa filter sebagai bahan perlakuan yang dibakar dan terpaparkan asapnya melalui *smoking pump*
- Bahan untuk perlakuan dan pemeriksaan : Eter (obat bius)

##### 4.6.2 Alat

- Kandang untuk hewan coba ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm, setiap kandang diisi dengan 3 ekor tikus
- Ember untuk berenang dengan kedalaman air 50 cm
- Timbangan Torbal (*Torsion Balance*) untuk menimbang berat badan tikus
- Logam pembebanan dimasukkan dalam plastik dan diikatkan pada ekor tikus
- Termometer untuk menyamakan suhu air
- Stop watch* digital
- Stoples dan kapas beralkohol untuk pembiusan tikus
- Papan, gunting dan pisau bedah (*minor surgery set*)
- Spuit 5 ml

- j. Spuit 5 ml berisi eter 5 ml
- k. Tabung untuk menyimpan darah
- l. Alat untuk *sentrifuge*
- m. *Incubator*
- n. *Microtube* serum
- o. Pipet hematokrit
- p. *Smoking pump*

#### 4.7 Prosedur Penelitian



##### 4.7.1 Adaptasi

Adaptasi hewan coba selama 7 hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dua hari pertama merupakan

waktu adaptasi kandang. Hari ketiga hewan coba diperkenalkan pada lingkungan berair namun belum berenang. Hari keempat dan kelima merupakan waktu aklimatisasi berenang tanpa beban. Hari keenam istirahat dan hari ketujuh dilakukan penentuan beban latihan.

Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 40 gram pakan dan diberikan secara *ad libitum*.

#### 4.7.2 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Pada sampel dilakukan randomisasi teknik *simple random sampling* secara undian sebanyak dua kali yaitu randomisasi pertama (R1) untuk menentukan anggota masing-masing kelompok, dan randomisasi kedua (R2) untuk menentukan jenis perlakuan masing-masing kelompok. Berdasarkan cara tersebut maka 28 ekor tikus dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 7 ekor, yaitu :

Kelompok K (-) : kelompok kontrol negatif

Kelompok K (+) : kelompok kontrol positif

Kelompok P1 : kelompok perlakuan latihan renang intensitas ringan

Kelompok P2 : kelompok perlakuan latihan renang intensitas berat

#### 4.7.3 Penimbangan Berat Badan

Penimbangan berat badan tikus dilakukan pada semua kelompok sebelum perlakuan pertama kali dan selanjutnya dilakukan setiap minggu sekali untuk menyesuaikan beban kerja dengan pertambahan berat badan hewan coba. Hewan coba ditimbang dengan timbangan Torbal dalam satuan gram dengan ketelitian 1/10 gram.

#### 4.7.4 Pemaparan Asap Rokok

Pemaparan asap rokok yang diberikan dari jenis rokok kretek tanpa filter dengan dosis 2 batang per hari (pagi dan sore) dalam 5 menit selama 8 minggu (Pawlak *et al*, 2011) dengan menggunakan *smoking pump* Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### 4.7.5 Penentuan Waktu Renang Maksimal

Dilakukan uji coba kemampuan renang untuk menentukan lama waktu latihan. Semua hewan coba (tikus) kelompok P1 dan P2 direnangkan menggunakan beban 3% dari berat badan untuk mencari nilai rata-rata dari waktu renang maksimal (ditandai dengan tenggelamnya tikus satu kali dan mengeluarkan gelembung-gelembung udara) (Mc Ardle, 1996 cit Santoso, 2001).

#### 4.7.6 Penentuan Waktu Renang Kelompok Perlakuan

Lama waktu renang untuk kelompok latihan renang intensitas ringan adalah 40% dari nilai rata-rata waktu renang maksimal, dan untuk kelompok latihan renang intensitas berat diperoleh dari persamaan : (Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 cit Athar, 1999)

$$9\% \text{ BB} \times \text{wb} = 3\% \text{ BB} \times \text{wr}$$

$$\text{wb} = \frac{3\% \times \text{wr}}{9\%}$$

Keterangan :

wb = lama waktu renang intensitas berat

wr = lama waktu renang intensitas ringan

#### 4.7.7 Penentuan Program Latihan

Program latihan renang yang diberikan adalah sebagai berikut : (Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 cit Athar, 1999)

1. Program latihan renang intensitas ringan :
  - Beban kerja : 40% dari nilai rata-rata waktu renang maksimal dengan beban pemberat 3% dari berat badan.
  - Frekuensi : 1x sehari, dilakukan 3 x seminggu
  - Lama latihan : 8 minggu
  - Waktu latihan : Pagi hari mulai pukul 12.00 WIB
2. Program latihan renang intensitas berat :
  - Beban kerja : lama waktu yang diperoleh dari persamaan, dengan beban pemberat 9% dari berat badan.
  - Frekuensi : 1x sehari, dilakukan 3 x seminggu
  - Lama latihan : 8 minggu

Waktu latihan : Pagi hari mulai pukul 12.00 WIB

#### 4.7.8 Pembiusan Hewan Coba

Pembiusan dilakukan pada kelompok kontrol (K- dan K+) dan kelompok perlakuan (P1 dan P2) 48 jam setelah perlakuan terakhir dan sebelumnya tikus telah dipuasakan 10 jam sebelum pembedahan.

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan eter kurang lebih 5 ml. untuk tiap ekor, dituang ke kapas dan dimasukkan dalam stoples pembiusan. Kurang lebih 1 menit tikus sudah tidak bernafas yang ditandai dengan mata meredup dan anggota badan tidak bergerak.

#### 4.7.9 Pengambilan Sampel Darah Hewan Coba

Pada hari akhir perlakuan, tikus dipuasakan selama 10 jam kemudian kadar kolesterol LDL diperiksa. Sebelum pengambilan darah *intracardiac* melalui *apex*, dilakukan pembiusan. Darah yang diambil sebanyak 3 ml.

#### 4.7.10 Pengukuran Kadar Kolesterol LDL Hewan Coba

Sampel darah tikus yang diambil dari jantung kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditunggu selama 30 menit - 3 jam hingga keluar serumnya. Kemudian serum disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, pada suhu ruang selama tiga puluh menit dengan *Hettich Zentrifugen*. Proses sentrifugasi dilakukan untuk mendapatkan serum yang murni. Selanjutnya serum dimasukkan kedalam tabung *ependrof* lalu segera dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol LDL. Kadar kolesterol LDL ditentukan secara enzimatik dengan alat spektrofotometer dan dinyatakan dengan satuan mg/dl. Prinsip metode ini adalah kolesterol dapat diubah menjadi partikel yang berwarna dan intensitasnya dapat diukur secara fotometrik.

### 4.8 Pengolahan Data

Data hasil perhitungan kadar kolesterol LDL masing-masing kelompok diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistik dengan menggunakan program analisis statistik. Sebelum dianalisis statistik, data yang ada diuji normalitasnya terlebih dahulu dengan metode *Sapphiro-Wilk*. Setelah uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan, dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA*. Kemudian dilakukan uji *Post Hoc* untuk mengetahui sampel mana yang berbeda dengan metode *LSD (Least Significant Differences)*. Untuk mengetahui apakah ada hubungan antara pengaruh yang terjadi dengan perlakuan latihan renang dengan kadar kolesterol LDL darah dilakukan uji korelasi dan uji regresi untuk meramalkan (memprediksikan) variabel terikat bila variabel bebas diketahui. Uji statistik dilakukan pada derajat kepercayaan 95% dengan  $\alpha=0,05$ . Hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila  $p < 0,05$ .

