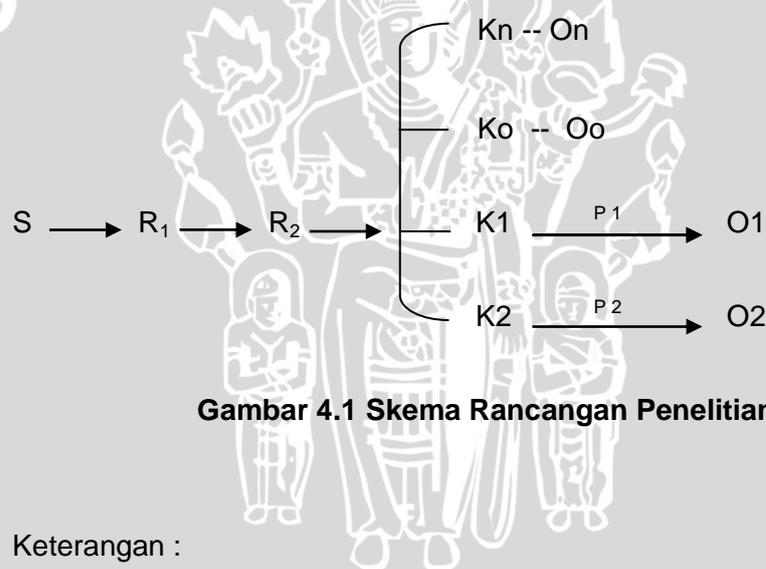


## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.



**Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian**

Keterangan :

- S : Sampel
- R<sub>1</sub> : Randomisasi 1 (*Simple Random Sampling*)
- R<sub>2</sub> : Randomisasi 2 (*Simple Random Sampling*)
- Kn : Kelompok kontrol negatif
- Ko : Kelompok kontrol *post test*
- K1 : Kelompok latihan renang intensitas ringan
- K2 : Kelompok latihan renang intensitas berat



- P1 : Perlakuan renang intensitas ringan  
 P2 : Perlakuan renang intensitas berat  
 On : Data kelompok tanpa perlakuan  
 Oo : Data kelompok kontrol  
 O1 : Data *post test* kelompok latihan renang intensitas ringan  
 O2 : Data *post test* kelompok latihan renang intensitas berat

#### 4.2 Sampel

Besar sampel menurut ketentuan penelitian hewan coba untuk perlakuan jangka pendek dari WHO adalah minimal 5 ekor tiap kelompok.

Besar sample 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.

Kriteria inklusinya adalah :

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar
- b. Umur 2 bulan
- c. Berat tubuh 200-250 gram
- d. Kondisi sehat (aktif bergerak), tidak ada kelainan anatomis
- e. Belum pernah digunakan penelitian

Kriteri drop-out adalah tikus putih yang sakit atau mati selama perlakuan berlangsung.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai dengan November 2014.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel bebas**

Latihan renang

##### **4.4.2 Variabel terikat**

Kadar HDL kolesterol darah

##### **4.4.3 Variabel kendali**

1. Jenis hewan coba

2. Jenis kelamin hewan coba
3. Umur hewan coba
4. Kesehatan fisik hewan coba
5. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

#### 4.5 Definisi Operasional

##### a. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar 8 minggu.

##### b. Paparan Asap Rokok

Metode paparan asap rokok sub akut melalui *smoking pump* dengan jenis rokok tertentu dan dosis 2 batang per hari untuk 3 tikus (pagi dan sore) dalam 5 menit selama 8 minggu.

##### c. Olahraga Renang

Perlakuan olahraga dilakukan dengan direnangkan dengan pemberat yang diikatkan pada bagian ekor tikus di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dosis olahraga yang dilakukan sebanyak 3 kali seminggu selama 8 minggu dengan berat pemberat dan durasi latihan berbeda setiap kelompok. (Ribeiro et al. 2012; Rodriguez et al.2006)

Latihan renang intensitas ringan yaitu latihan dalam bentuk renang dengan menggunakan beban seberat 3% dari berat badan hewan coba (tikus) yang diikatkan 5 cm dari ujung ekor (Mc. Ardle, 1966 *cit* Athar, 1999), dengan suhu air 30° C. Latihan renang intensitas ringan diberikan dengan frekuensi latihan 1 kali sehari,

dilakukan 3 kali seminggu (Senin, Rabu, Jumat) dengan waktu 40% dari rata-rata waktu renang maksimal dan dilakukan selama 8 minggu.

Latihan renang intensitas berat yaitu latihan dalam bentuk renang menggunakan beban seberat 9% dari berat badan hewan coba (tikus) yang diikatkan 5 cm. dari ujung ekor (Mc. Ardle, 1966), dengan suhu air 30° C. Latihan renang intensitas berat diberikan dengan frekuensi latihan 1 kali sehari, dilakukan 3 kali seminggu (Senin, Rabu, Jumat) dengan waktu sesuai dengan perhitungan yang ditetapkan dan dilakukan selama 8 minggu.

Setelah diberikan perlakuan latihan renang hewan coba dikeringkan dengan menggunakan handuk, kemudian dijemur dibawah sinar matahari hingga bulu mengering.

d. Kadar Kolesterol HDL Darah

Kadar HDL kolesterol diukur dengan spektrofotometer, skala rasio dengan metode CHOD-PAP.

## 4.6 Alat dan Bahan

### 4.6.1 Perawatan Tikus

Untuk merawat tikus, dibutuhkan kandang dari bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm setiap kandang diisi dengan 7 ekor tikus, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, dan timbangan berat badan dengan neraca *Torsion Balance*.

#### 4.6.2 Pemaparan Asap Rokok

Alat untuk memapar asap rokok adalah *smoking pump*, korek, dan gunting klep.

Sedangkan bahan untuk memapar adalah rokok kretek merek tertentu yang sejenis.

#### 4.6.3 Perlakuan olahraga renang

Alat yang digunakan untuk merenungkan tikus adalah ember plastik berisi air sedalam 50 cm, termometer untuk mengukur suhu air, stopwatch digital, dan logam pembeban (klip kertas yang diikatkan dengan menggunakan benang.

#### 4.6.4 Pengambilan sampel darah

Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel darah adalah kapas beralkohol, *minor surgery set*, spuit 5 ml, ketamin 0,2 ml yang ditaruh pada kapas untuk pembiusan, dan tabung untuk menyimpan darah.

#### 4.6.5 Pengukuran kadar HDL kolesterol

Alat yang digunakan untuk pengukuran HDL kolesterol darah tikus adalah spektrofotometer, *incubator*, mikrotube serum, alat untuk *sentrifuge*, dan pipet hematokrit.

## 4.7 Pelaksanaan Penelitian

### 4.7.1 Adaptasi

Adaptasi hewan coba selama 7 hari dalam kondisi Laboratorium Farmakologi FKUB. 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 pada satu ekor tikus dari masing-masing kelompok perlakuan latihan renang yang direnangkan dengan beban 3% dari berat badannya hingga mengeluarkan gelembung pertamanya di dalam air.

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 Ko : Kelompok kontrol *pretest*

Kelompok Kn : Kelompok kontrol negatif

Kelompok K1 : Kelompok perlakuan latihan renang intensitas ringan

Kelompok K2 : 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 tertentu dengan dosis 2 batang per hari (pagi dan sore) dalam 5 menit selama 8 minggu 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. Satu hewan coba (tikus) kelompok K1 dan K2 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 :

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

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

(Sumber : Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 *cit* Athar, 1999)

Keterangan :

wb = lama waktu renang intensitas berat

wr = lama waktu renang intensitas ringan

#### 4.7.7 Penentuan Program Latihan

1. Program latihan renang intensitas ringan adalah sebagai berikut:

Beban kerja : 40% dari nilai rata-rata waktu renang maksimal dengan beban pemberat 3% dari berat badan.

Frekuensi : 1x sehari, dilakukan 3 x seminggu

(Senin, Rabu, Jumat)

Lama latihan : 8 minggu

Waktu latihan : Pagi hari mulai pukul 09.00 WIB

2. Program latihan renang intensitas berat adalah sebagai berikut:

Beban kerja : Lama waktu yang diperoleh dari persamaan dengan beban pemberat 9% dari berat badan.

Frekuensi : 1x sehari, dilakukan 3 x seminggu (Senin, Rabu, Jumat)

Lama latihan : 8 minggu

Waktu latihan : Pagi hari mulai pukul 09.00 WIB

(Bompa, 1994; Fox, 1999; Mc Ardle, 1966 cit Athar, 1999)

Setelah diberikan perlakuan latihan renang hewan coba dikeringkan menggunakan handuk dan dijemur dibawah sinar matahari hingga bulu hewan coba mengering.

#### 4.7.8 Pembiusan Hewan Coba

Pembiusan dilakukan pada kelompok kontrol *post test* (K<sub>0</sub>), kelompok kontrol negatif (K<sub>n</sub>), dan kelompok perlakuan renang (K<sub>1</sub> dan K<sub>2</sub>) 48 jam setelah perlakuan terakhir dan sebelumnya tikus telah dipuasakan 10 jam sebelum pembedahan.

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan klorofom kurang lebih 5ml 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

Pada hari akhir perlakuan, tikus dipuaskan selama 10 jam kemudian kadar HDL diperiksa. Pengambilan darah intracardiac melalui apex sebanyak 3 ml.

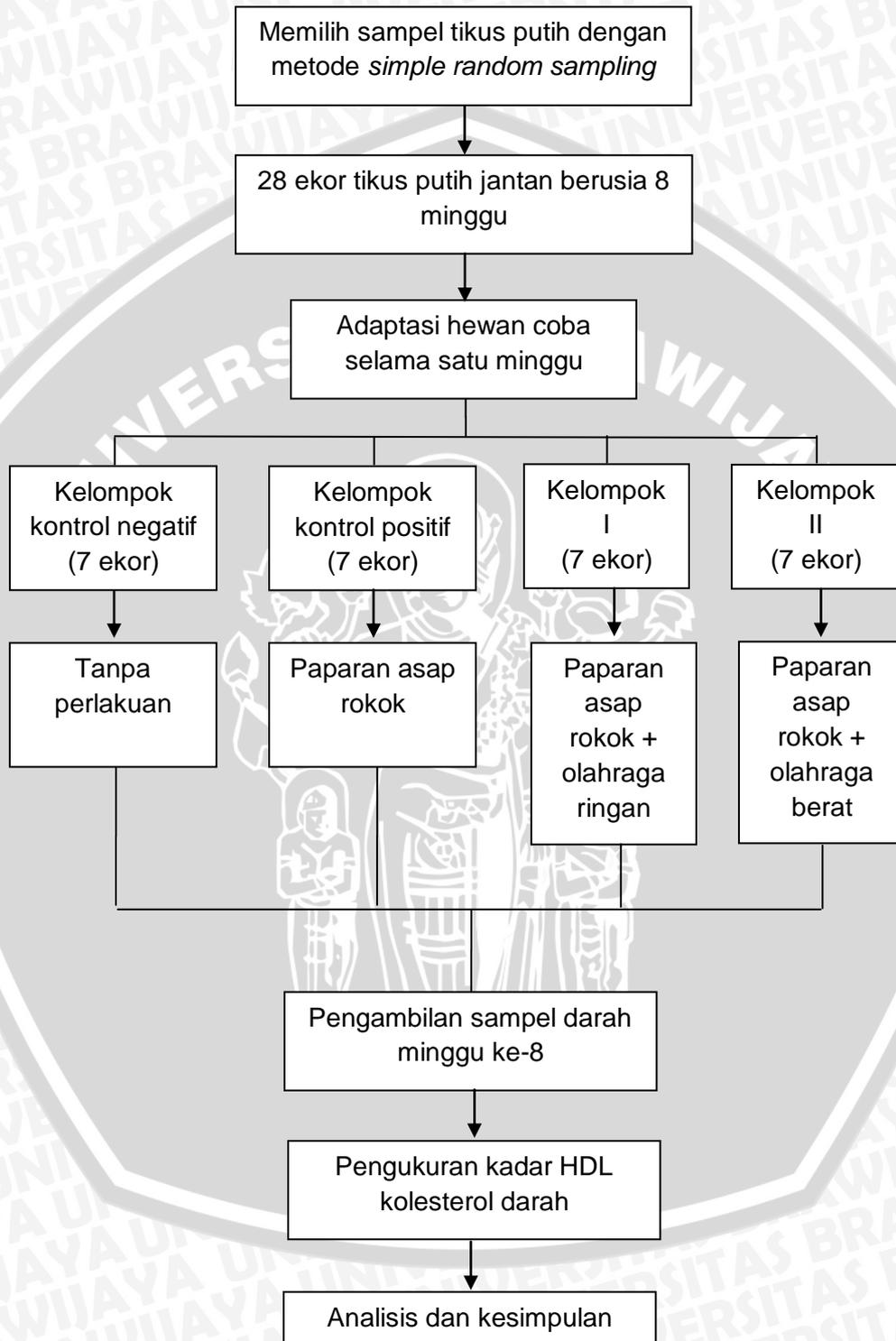
#### 4.7.10 Pengukuran Kadar HDL Kolesterol

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 HDL. Kadar kolesterol HDL ditentukan secara enzimatik dengan metode CHOD-PAP. 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 HDL masing-masing kelompok diolah dengan cara tabulasi. Berdasarkan tabulasi tersebut, dilakukan uji statistik dengan menggunakan SPSS 20.0. Sebelum dianalisis statistik, data yang ada diuji normalitasnya terlebih dahulu dengan metode *Saphiro-Wilk*. Apabila dari uji normalitas data dinyatakan normal, maka akan 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 efek yang terjadi dengan perlakuan olahraga renang dengan kadar HDL kolesterol 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  $p < 0,05$ .





Gambar 4.2 Skema Alur Kerangka Kerja Penelitian



Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Bulan ke-															
	1				2				3				4			
	Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>I. Persiapan</b>																
1.1 Persiapan laboratorium farmakologi dan biokimia.	√															
1.2 persiapan ethical clearance	√															
1.3 Aklimatisasi tikus		√														
1.4 Penyediaan alat untuk olahraga renang, smoking pump		√														
1.5 Pembelian pakan tikus dan rokok		√														
<b>II. Pelaksanaan</b>																
2.1 Perlakuan olahraga renang			√	√	√	√	√	√	√	√						

2.2 Pemberian paparan asap rokok			√	√	√	√	√	√	√	√							
2.3 Pemberian pakan			√	√	√	√	√	√	√	√							
2.4 Pengambilan sampel darah tikus											√						
2.5 Pengukuran kadar HDL kolesterol darah tikus											√						
<b>III. Pengumpulan Data dan Evaluasi Hasil</b>																	
3.1 Evaluasi hasil												√					
3.2 Pengumpulan data												√	√				
3.3 Analisa dan pengolahan data														√	√	√	
3.4 Penarikan kesimpulan dan penyusunan laporan kegiatan														√	√	√	