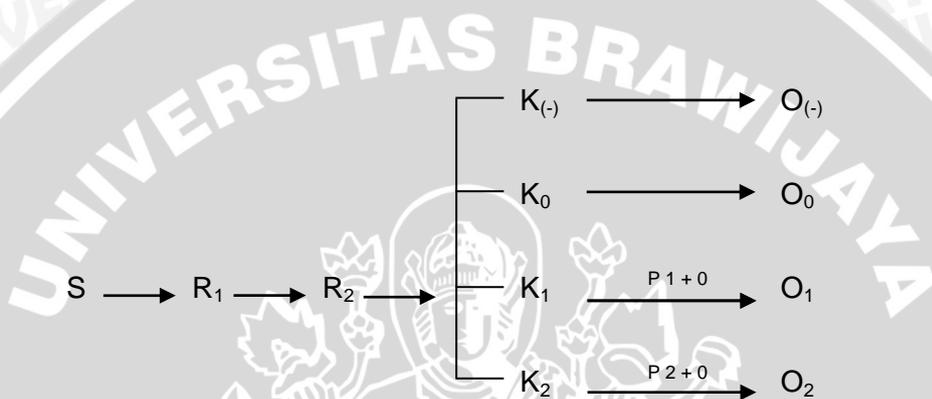


BAB IV
METODE PENELITIAN

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

R₁ : Randomisasi 1 (*Simple Random Sampling*)

R₂ : Randomisasi 2 (*Simple Random Sampling*)

K₍₋₎ : Kelompok kontrol negatif

K₀ : Kelompok kontrol positif (hanya paparan asap rokok)

K₁ : Kelompok latihan renang intensitas ringan

K₂ : Kelompok latihan renang intensitas berat

P_{1+0} : Perlakuan renang intensitas ringan + paparan asap rokok

P_{2+0} : Perlakuan renang intensitas berat + paparan asap rokok

$O_{(-)}$: Data kelompok kontrol negatif

O_0 : Data kelompok kontrol positif

O_1 : Data kelompok latihan renang intensitas ringan

O_2 : Data kelompok latihan renang intensitas berat

4.2 Populasi dan 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 α 0,05 (satu arah) = 1,65

$Z\beta$ = harga standar β 0,2 = 0,84

σ = 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 σ (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 8 minggu
- c. Berat tubuh 200-250 gram
- d. Kondisi sehat (aktif bergerak), tidak ada kelainan anatomis
- e. Belum pernah digunakan penelitian

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

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai dengan Oktober 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

1. Latihan renang intensitas ringan
2. Latihan renang intensitas berat

4.4.2 Variabel terikat

1. Ketebalan tunika intima sampai tunika media arteri

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

1. Hewan coba

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

2. Paparan Asap Rokok

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

3. Olahraga Renang

a) 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 5 kali seminggu dengan waktu 40% dari rata-rata waktu renang maksimal dan dilakukan selama 8 minggu.

b) 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 cit Athar, 1999), dengan suhu air 30° C. Latihan renang intensitas

berat diberikan dengan frekuensi latihan 1 kali sehari, dilakukan 5 kali seminggu dengan waktu sesuai dengan perhitungan yang ditetapkan dan dilakukan selama 8 minggu.

4. Ketebalan Dinding Arteri

Ketebalan dinding arteri yang dimaksud pada penelitian ini mencakup:

a) Ketebalan tunika intima sampai tunika media

Ketebalan tunika intima sampai tunika media sebagai indeks tebal dinding pembuluh darah arteri. Ketebalan pada kelompok yang hanya dipapar asap rokok dibandingkan dengan tebal dinding normal pada arteri tikus yang tidak dipapar asap rokok, serta dengan kelompok yang dipapar asap rokok dengan intervensi latihan renang intensitas ringan dan berat. Preparat yang diamati dengan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x, kemudian di-scan dengan *scanner* mikroskopik Olympus yang sudah terkalibrasi otomatis dengan acuan mikrometer. Ketebalan dinding arteri dapat mulai diukur dengan cara menarik garis dari sisi dalam lumen arteri (tunika intima) sampai batas luar tunika media arteri. Gambar kemudian diukur dengan perangkat lunak DotSlide dengan acuan 8 zona. Diseksi dilakukan di laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya setelah 8 minggu perlakuan. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan pengecatan HE (Hematoksilin dan Eosin).

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Bahan

a) Pakan dan minum standar tikus.

Komposisi pakan:

Air : Maks. 12%

Protein kasar : Min. 12%

Lemak kasar : 3-7%

Serat kasar : Maks. 8%

Abu : Maks. 10%

Kalsium : 0.9-1.0%

Phosphor : 0.7-1.0%

Coccidiostat : +

Antibiotika : +

Bahan baku yang digunakan : jagung kuning, SBM, wheat bran, palm olein, asam amino esensial, mineral esensial, premix, vitamin.

- b) Tikus jantan galur wistar sebagai bahan coba yang memenuhi kriteria inklusi, mendapat pakan dan minum standar
- c) Rokok kretek tanpa filter sebagai bahan perlakuan yang dibakar dan dipaparkan asapnya melalui smoking pump
- d) Bahan untuk perlakuan dan pemeriksaan : *Kloroform* (obat bius)

4.6.2 Alat

- a) Kandang untuk hewan coba ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm, setiap kandang diisi dengan 5 ekor tikus
- b) Ember untuk berenang dengan kedalaman air 50 cm
- c) Timbangan Torbal (*Torsion Balance*) untuk menimbang berat badan tikus
- d) Logam pembebanan (klip kertas) yang diikatkan pada benang
- e) Termometer untuk mengukur suhu air
- f) *Stop watch* digital
- g) Stoples dan kapas beralkohol untuk pembiusan tikus

- h) Papan, gunting dan pisau bedah (*minor surgery set*)
- i) Inkubator
- j) Kloroform
- k) *Smoking pump*
- l) Formalin / larutan etanol 70%, 80%, 90%, 95% untuk proses pengamatan jaringan arteri.
- m) Xylol untuk proses pengamatan jaringan arteri.
- n) Parafin untuk proses pengamatan jaringan arteri.

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.

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 K₀ : kelompok control positif
- Kelompok K₍₋₎ : 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 penambahan 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 dengan menggunakan *smoking pump* di 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 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 :

$$9 \% BB \times wb = 3 \% BB \times wr$$

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

(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)

4.7.8 Pembiusan Hewan Coba

Pembiusan dilakukan pada kelompok kontrol positif (K_0) dan kelompok perlakuan renang (K_1 dan K_2) 48 jam setelah perlakuan terakhir dan sebelumnya tikus telah dipuasakan 10 jam sebelum pembedahan.

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan kloroform, 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 Jaringan Arteri

Taruh tikus yang sudah dianestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Arteri yang diambil adalah aorta dari aorta thoracalis sampai aorta abdominalis sepanjang 5 cm dari pangkal aorta. Jaringan yang diambil kemudian direndam ke cairan fiksatif, formalin 10%.

4.7.10 Pembuatan Preparat

1) Memotong jaringan organ

Setelah jaringan arteri yang berada di dalam larutan formalin siap, jaringan ditiriskan pada saringan selanjutnya dipotong menggunakan scalpel dengan ketebalan 0,3-0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus.

2) Proses dehidrasi

Keranjang khusus (*basket*) yang di dalamnya berisi jaringan arteri, dimasukkan ke dalam mesin prosesor otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu sebagai

berikut: ethanol 70% (2 jam), ethanol 80% (2 jam), ethanol 90% (2 jam), ethanol absolute (2 jam), ethanol absolute (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam), parafin cair (2 jam), parafin cair (2 jam). Selanjutnya keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk proses berikutnya.

3) Vakum

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpa keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur 59-60°C, di-vakum selama 30 menit. Keranjang diangat, *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60°C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair.

4) Mencetak blok parafin

Cetakan dari bahan *stainless steel* dihangatkan di atas api bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara itu di tempat lain telah disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di *freezer* (-20°C) sebelum dilakukan pemotongan.

5) Memotong blok jaringan

Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3-4 µm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46°C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi

ewith, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai.

6) Proses pewarnaan hematoksilin dan eosin

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut:

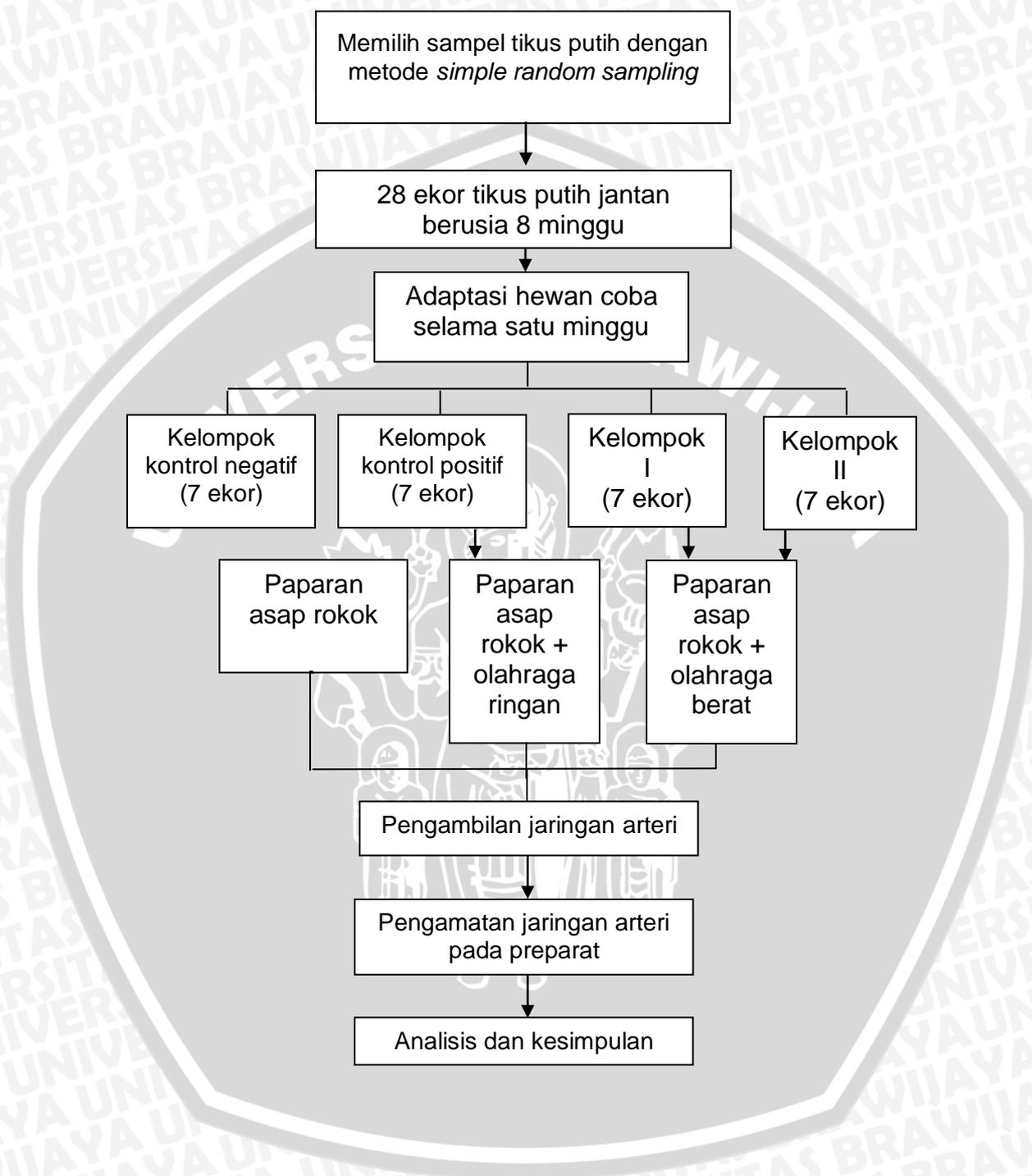
- a. Xylol : 3 menit
- b. Xylol : 3 menit
- c. Ethanol absolute : 3 menit
- d. Ethanol absolute : 3 menit
- e. Ethanol 90% : 3 menit
- f. Ethanol 80% : 3 menit
- g. Bilas dengan air keran : 1 menit
- h. Larutan hematoksilin : 6-7 menit
- i. Bilas dengan air keran : 1 menit
- j. Larutan pembiru : 1 menit
- k. Air keran : 1 menit
- l. Larutan eosin : 1-5 menit
- m. Bilas dengan air keran : 1 menit
- n. Erhanol 80% : 10 celupan
- o. Ethanol 90% : 10 celupan
- p. Ethanol absolute : 10 celupan
- q. Ethanol absolute : 1 menit
- r. Xylol : 3 menit
- s. Xylol : 3 menit
- t. Xylol : 3 menit

Preparat diangkat satu per satu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dilihat di bawah mikroskop.

4.8 Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri

Ketebalan dinding arteri diukur menggunakan perangkat lunak DotSlide yang sudah terkalibrasi otomatis dengan acuan ukur micrometer (μm). Sebelum mulai pengukuran, preparat di-scan terlebih dahulu dengan *scanner* mikroskopik dari Olympus dengan perbesaran mikroskop sebesar 400x. Setelah itu tebal dinding arteri dapat mulai diukur dengan cara menarik garis dari sisi dalam lumen arteri yaitu tunika intima sampai batas luar tunika media. Data pengukuran didapat dari 8 zona pengukuran, yaitu arah jam 12.00, 13.30, 15.00, 16.30, 18.00, 19.30, 21.00, 22.30 yang kemudian dirata-rata ketebalannya.

Gambar 4.2 Skema Alur Kerangka Kerja Penelitian



4.9 Jadwal Kegiatan

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
I. Persiapan																
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		√														
II.																

Pelaksanaan																			
2.1 Perlakuan olahraga renang		√	√	√	√	√	√												
2.2 Pemberian paparan asap rokok		√	√	√	√	√	√												
2.3 Pemberian pakan		√	√	√	√	√	√												
2.4 Pengambilan dan pembuatan preparat jaringan arteri									√										
2.5 Pengamatan pada preparat									√										
III. Pengumpulan Data dan Evaluasi Hasil																			

