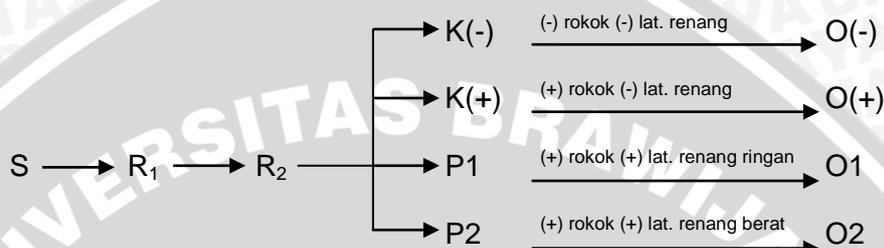


BAB IV

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 *post test* negatif
- K(+): Kelompok kontrol *post test* positif
- P1 : Kelompok perlakuan renang intensitas ringan
- P2 : Kelompok perlakuan renang intensitas berat
- O(-) : Data *post test* kelompok kontrol negatif
- O(+): Data *post test* kelompok kontrol positif
- O1 : Data *post test* kelompok latihan renang intensitas ringan
- O2 : Data *post test* kelompok latihan renang intensitas berat

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus putih jantan karena tikus betina terdapat estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol. Tikus



yang digunakan berusia 8 minggu yang dipapar asap rokok dan kemudian diberikan perlakuan. 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 α = harga standar α 0,05 (satu arah) = 1,65

Z β = 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:

- Tikus jantan
- Umur 8 minggu
- Kondisi sehat (aktif bergerak), tidak ada kelainan anatomis
- 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, Laboratorium Anatomi-Histologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai dengan Desember 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah olahraga dengan metode *swimming exercise* yang dibagi dalam kelompok:

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

4.4.2 Variabel terikat

1. Gambaran jumlah sel radang trakea tikus

4.4.3 Variabel kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

1. Jenis tikus
2. Umur tikus
3. Berat badan tikus
4. Pemberian asap rokok
5. Kondisi lingkungan kandang
6. Pemberian perlakuan intensitas latihan renang

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba

hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* berusia 8 minggu.

2. Asap rokok

Metode paparan asap rokok melalui *smoking pump* dengan jenis rokok kretek dan dosis 2 batang per hari untuk 3 tikus (pagi dan sore) dalam waktu yang telah ditentukan selama 8 minggu.

3. Latihan renang

Perlakuan olahraga dilakukan dengan latihan renang 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 *cit* Athar, 1999), 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 perlakuan renang tikus dikeringkan dengan menggunakan handuk hingga setengah kering kemudian dijemur di bawah sinar matahari.

4. Sel Radang

Sel radang yang ditemukan pada preparat histopatologi submukosa trakea tikus dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x per lapang pandang, sebanyak 8 lapang pandang, dilakukan *scan* dan dibuka menggunakan *software* komputer OlyVIA (*Olympus Viewer for Imaging Applications*). Pada saat penghitungan tidak dibedakan sel radang akut (neutrofil, eosinofil, basofil) atau sel radang kronis (limfosit, sel plasma, dan makrofag), karena pada perbesaran 400x perbedaan sel-sel tersebut sukar dilakukan.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

- a. Pakan dan minum standar tikus (normal) berupa dedak hasil sampingan penggilingan padi mengandung protein, lemak, dan vitamin B1 yang dicampur dengan tepung dengan komposisi 3:1
- 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)
- e. Bahan untuk mengamati jaringan trakea: formalin buffer 10%, cat hematoksilin-eosin, paraffin, xylol, etanol 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, gelatin

4.6.2 Alat

- a. Kandang untuk hewan coba ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm, setiap kandang diisi dengan 6 ekor tikus
- b. Ember untuk berenang dengan kedalaman air 50 cm
- c. Timbangan Torbal (*Torsion Balance*) untuk menimbang berat badan tikus
- d. Logam pembebanan (uang logam) & karet gelang yang dimasukkan ke dalam plastik bening dan 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. Wadah plastik dengan tutup tempat menyimpan jaringan
- j. *Smoking pump*
- k. Mikroskop cahaya
- l. Kamera untuk foto histopatologi
- m. *Software* computer yang mendukung (OlyVIA)
- n. *Object Glass*
- o. Penjepit mikrotom

4.7 Prosedur 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 masa adaptasi dan perlakuan selanjutnya jika tikus akan dipindahkan, tikus dipegang pada bagian ekor sehingga tikus tidak stress dan berontak.

Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal) berupa dedak hasil sampingan penggilingan padi mengandung protein, lemak, dan vitamin B1 yang dicampur dengan tepung dengan komposisi 3:1. 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 *posttest* negatif

Kelompok K(+): kelompok kontrol *posttest* positif (dipapar asap rokok)

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 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 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. Salah satu hewan coba (tikus) kelompok perlakuan direnangkan menggunakan beban 3% dari berat badan yang diikatkan pada pangkal ekor tikus untuk mencari nilai 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 :

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

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

$$9 \%$$

(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 : Siang hari mulai pukul 12.00 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 : Siang hari mulai pukul 12.00 WIB

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

4.7.8 Pembiusan Hewan Coba

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

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan kloroform (CHCl_3) 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 Pembedahan & Pengambilan Jaringan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Letakkan tikus yang sudah diberi anestesi di atas papan, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Setelah itu, ambil trakea dan fiksasi ke dalam formalin 10%. Setelah pembedahan selesai bangkai tikus dikumpulkan kemudian dikuburkan.

4.7.10 Pembuatan preparat histopatologi

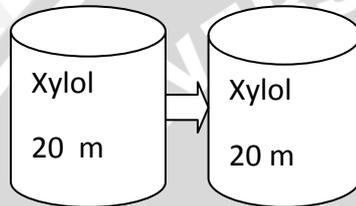
I. Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros

1. Gross hasil bedah dimasukan ke larutan formalin 10% (fiksasi) semalam.
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti.
3. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter.
4. Di masukan kekaset dan di beri kode sesuai dengan kode gross peneliti.
5. Dimasukan ke larutan formalin 10 % sebelum di proses/ dimasukan ke alat Tissue Tex Prosesor.
6. Di proses menggunakan alat/mesin Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit.
7. Alarm bunyi tanda selesai.

II. Proses Pengeblokan & Pemotongan Jaringan

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

III. Proses Deparafinisasi



Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

IV. Proses Pewarnaan (Hematoksilin-Eosin)

- | | |
|---|-------------|
| 1. Cat utama Harris Hematoksilin 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 |

V. Dehidrasi

- | | |
|--------------------|---------|
| 1. Alkohol 70% | 3 menit |
| 2. Alkohol 80% | 3 menit |
| 3. Alkohol 96% | 3 menit |
| 4. Alkohol Absolut | 3 menit |

VI. Penjernihan (Clearring) :

1. Xylol 60 menit
2. Xylol 60 menit

VII. Mounting dengan entelan dan *deckglass*

1. Biarkan slide kering pada suhu ruangan
2. Setelah slide kering siap untuk diamati

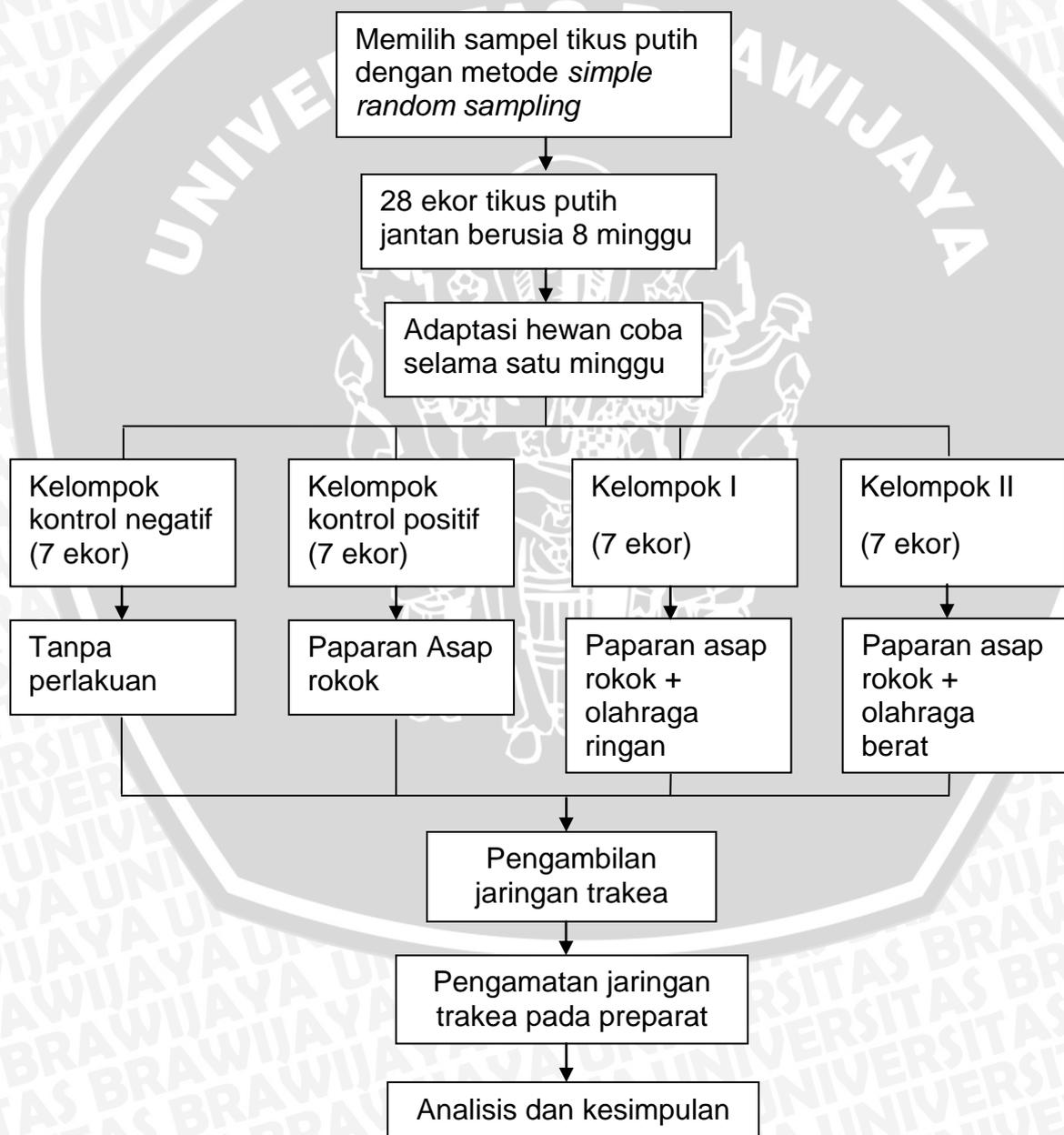
4.7.11 Pengamatan Hasil

Penghitungan sel radang dilakukan dengan melakukan penghitungan secara manual pada sediaan histologi trakea tikus yang dihitung pada gambaran hasil *scan dot* yang dihasilkan dengan program OlyVIA (*Olympus Viewer for Imaging Applications*) pada pembesaran 400x. Pengamatan pada satu sampel jaringan dibagi menjadi 8 lapang pandang. Variabel yang diamati adalah jumlah sel radang pada lamina propria & submukosa trakea tikus. Sel radang meliputi eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit, monosit, dan sel plasma dihitung tanpa membedakan jenis sel radang. Nilai yang diperoleh kemudian dirata-rata pada setiap kelompok. Hal ini dilakukan untuk mempermudah membandingkan jumlah sel radang pada setiap kelompok kontrol dan perlakuan.

4.8 Analisis Data

Pengolahan data menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* 16.0. Sebelum dianalisis statistik, data yang ada diuji normalitasnya terlebih dahulu dengan metode *Kolmogrov-Smirnov*. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene's Test*. Apabila dari uji normalitas dan homogenitas data dinyatakan normal dan homogen, maka akan dilanjutkan dengan statistik *One Way ANOVA*. Kemudian dilakukan uji *Post Hoc Tukey* 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 perubahan gambaran histologi trakea, 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 6 : 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 latihan renang			√	√	√	√	√	√	√	√						
2.2 Pemberian paparan asap rokok			√	√	√	√	√	√	√	√						

2.3 Pemberian pakan			√	√	√	√	√	√	√	√							
2.4 Pengambilan sampel jaringan trakea tikus											√						
2.5 Pengamatan jaringan trakea tikus											√	√					
III. Pengumpulan Data dan Evaluasi Hasil																	
3.1 Evaluasi hasil												√					
3.2 Pengumpulan data												√	√				
3.3 Analisa dan pengolahan data												√	√	√			
3.4 Penarikan kesimpulan dan penyusunan laporan kegiatan												√	√	√	√		