

BAB IV METODOLOGI

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental (true experiment designs) dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 5 kelompok (1 sampai dengan 5), yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus bunting.

- Kelompok kontrol (-): tikus bunting tanpa dipapar asap rokok dan ekstrak buah naga merah
- Kelompok kontrol (+): tikus bunting yang dipapar asap rokok tanpa diberi ekstrak buah naga merah

Kelompok 1-3: kelompok perlakuan, dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak buah naga merah dengan dosis berbeda per oral dengan sonde. Tikus dipapar asap rokok dilanjutkan pemberian ekstrak buah naga merah dengan berbagai dosis 500mg/ kg BB tikus, 1000mg/ kg BB tikus, 2000mg/ kg BB tikus. Ekstrak buah naga merah dan pemaparan asap rokok diberikan mulai hari ke-4 hingga hari ke-19 kebuntingan. Pembedahan tikus dilakukan pada hari ke-20 kebuntingan serta diukur berat badan lahir tikus.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini dibagi dalam jumlah replikasi (n) pada setiap perlakuan (p) dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) dengan $p=5$:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$pn - p \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan didapatkan $n \geq 4$. Jadi dilakukan minimal 5 kali replikasi untuk masing – masing kelompok. Dalam penelitian ini digunakan 5 ekor tikus bunting sebagai sampel untuk masing – masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 25 ekor.

1. Kriteria Inklusi

- Jenis kelamin tikus : betina
- Berat badan tikus : 180 - 200 gram
- Umur tikus : minimal 8 minggu
- Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata yang jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih.
- Bunting

2. Kriteria Eksklusi

- Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
- Terlalu cepat melahirkan (keguguran dan prematur)
- Tikus cacat

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

- Pemaparan asap rokok
- Pemberian ekstrak buah naga merah

2. Variabel Tergantung

- Berat badan bayi lahir pada tikus bunting yang terpapar asap rokok.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Makanan hewan coba adalah makanan ternak dan minuman hewan coba adalah air keran.

4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

a. Rokok

Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok kretek.

b. Ekstrak buah naga merah

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang berada dipasaran.

4.6 Alat Penelitian

4.6.1 Alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- Kandang tikus yang berupa box plastik berukuran 43 x 35 x 13 cm sebanyak 5 buah diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa. Masing – masing kandang ditempati 5 tikus bunting.

- Tempat makan dan minum

4.6.2 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- Neraca ohaus

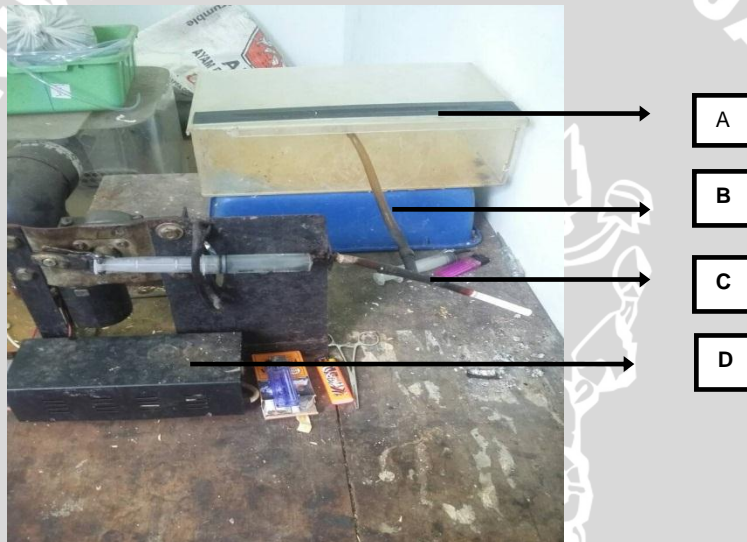
4.6.3 Alat untuk Pembuatan Ekstrak Buah Naga Merah

Alat untuk membuat ekstrak buah naga merah ialah: blender, pisau, talenan, saringan kain, gelas ukur, sendok, waskom plastik, botol untuk menyimpan ekstrak buah naga merah.

4.6.4 Alat untuk Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah pada Hewan Coba

- Spuit 3 ml
- Sonde

4.6.5 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba



Gambar 4.1 Smoking Pump

Keterangan gambar:

- A: Box tikus
B: Selang penyalur asap rokok
C: Selang untuk meletakkan rokok
D: Saklar *Smoking pump*

Prosedur pemakaian smoking pump dengan cara memasukkan tikus ke dalam box tikus yang akan dihubungkan dengan saluran yang menghasilkan asap rokok. Satu batang rokok kretek dipasang pada selang. Saklar dinyalakan

sambil membakar rokok dibantu dengan klem untuk menjepit selang penyalur asap rokok agar menghasilkan asap rokok yang maksimal.

4.6.6 Alat Pembedahan dan Pengambilan Bayi

- a. Kapas
- b. Scalpel
- c. Gunting
- d. Pinset
- e. Jarum pentul
- f. Alas kayu
- g. Handscoon

4.6.7 Alat untuk Pengukuran Berat Badan Bayi Tikus Baru Lahir

- a. Sarung tangan
- b. Neraca analitik
- c. Box bayi tikus baru lahir

4.7 Definisi Operasional

1. Hewan coba

Hewan coba ialah tikus (*Rattus norvegicus*) betina bunting yang berusia minimal 8 minggu dengan berat badan 180-200 gram.

2. Tikus bunting

Tikus bunting ialah tikus betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dan menunjukkan tanda-tanda kebuntingan yaitu terdapat sumbat vaginal (*vaginal plaque*) yang merupakan penggumpalan air mani dan berasal dari sekresi kelenjar khusus betina.

3. Usia kebuntingan tikus

Usia kebuntingan tikus dihitung dari pertama kali muncul sumbat vagina (*vaginal plaque*) sampai hari ke-20.

4. Asap rokok

Pemaparan asap rokok dimulai pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-19 kebuntingan menggunakan rokok kretek 1 batang per hari selama 7,5 menit menggunakan alat *smooking pump* milik Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

5. Ekstrak buah naga merah

Ekstrak buah naga merah (*Hylocereus Polyrhizus*) merupakan buah naga merah yang diambil daging buahnya yang didapatkan dari pasar buah dan kemudian diolah menjadi ekstrak menggunakan etanol. Ekstrak buah naga merah diberikan per oral menggunakan sonde dengan pengelompokan dosis yang ditentukan dalam rancangan penelitian yaitu: 500 mg/kgBB, 1000mg/kgBB, 2000 mg/kgBB.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Cara Kerja

4.8.1.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan selama tujuh hari terhadap kondisi air, makanan dan suhu di dalam laboratorium.

4.8.1.2 Prosedur Pembuntingan Hewan Coba

Pengawinan hewan dilakukan pada masa estrus dengan mencampurkan hewan jantan dan betina. Tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina dan dipisahkan lagi keesokan harinya. Bila ditemukan sumbat vagina. Berarti tikus telah mengalami kopulasi dan berada pada hari kehamilan ke nol. Tikus yang

telah hamil dipisahkan dan yang belum kawin dicampur kembali dengan tikus jantan. Pengawinan dilakukan dengan mencampurkan empat ekor tikus betina dan satu ekor tikus jantan dengan perbandingan 1:4 dalam satu kandang (Almahdi dalam Arifin, 2007).

4.8.1.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi 5 kelompok, 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang masing – masing terdiri dari 5 ekor tikus bunting dengan rincian:

- Kelompok Kontrol:
 - a. Negatif: tanpa dipapar asap rokok dan ekstrak buah naga merah
 - b. Positif: dipapar asap rokok tanpa diberi ekstrak buah naga merah
- Kelompok Perlakuan:
 - a. Perlakuan 1: dipapar asap rokok diberi ekstrak buah naga merah dosis 500 mg/ kgBB tikus
 - b. Perlakuan 2: dipapar asap rokok diberi ekstrak buah naga merah dosis 1000 mg/ kgBB tikus
 - c. Perlakuan 3: dipapar asap rokok diberi ekstrak buah naga merah dosis 2000 mg/ kgBB tikus

4.8.1.4 Ekstraksi Buah Naga Merah

1. Proses pengeringan
 - a. Dari 2500 gram buah naga merah.
 - b. Kulit dipisahkan dari daging buah.
 - c. Dipotong tipis-tipis.
 - d. Dipanaskan pada matahari dengan dibantu suhu oven 60° (kandungan bebas air).
2. Proses ekstraksi

- a. Setelah kering, daging buah naga merah ditimbang menjadi 342 gram.
 - b. Daging buah naga merah dihaluskan menggunakan blender sampai halus.
 - c. Ditimbang tiap 100 gram kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 L.
 - d. Direndam dengan etanol sampai volume 1L.
 - e. Dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
 - f. Didiamkan satu malam sampai benar-benar mengendap.
 - g. Lapisan atas atau bagian pelarut diambil lalu disaring dengan kertas saring. Proses ini dilakukan sampai cairan menjadi jernih.
3. Proses evaporasi
- a. Cairan yang sudah disaring sampai jernih dimasukkan ke dalam labu evaporasi.
 - b. Labu evaporasi dipasang dalam evaporator.
 - c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
 - d. Semua rangkaian alat dipasang (*rotatory evaporator*, pemanas *water bath* diatur pada suhu 90°) kemudian disambungkan dengan aliran listrik.
 - e. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
 - f. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
 - g. Hasil yang diperoleh 95 gram ekstra buah naga merah dalam bentuk liquid.
 - h. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik
 - i. Disimpan dalam freezer sampai penggunaan (Andari, 2012).
4. Proses Pengenceran

- a. Ambil ekstrak buah naga merah sesuai dosis, kemudian di timbang di neraca analitik.
- b. Siapkan air untuk mengencerkan.
- c. Homogenkan air dan ekstrak buah naga merah di mortar, diaduk sampai homogen.
- d. Simpan ekstrak buah naga merah di wadah.
- e. Ekstrak yang sudah di encerkan simpan di kulkas.

4.8.1.5 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus Wistar dipelihara dan di adaptasikan dalam laboratorium selama tujuh hari pada temperatur ruangan konstan. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik berukuran 43 x 35 x 12 cm, masing – masing untuk 5 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam. Porsi makanan tikus adalah 40 g/ hari/ ekor.

4.8.1.6 Penentuan Dosis

Penelitian oleh Viastiya (2013) yang meneliti tentang efek ekstrak etanol 70% buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) membuktikan bahwa kandungan flavonoid yang mampu menangkap radikal hidroksil mampu menurunkan kadar glukosa darah tikus berturut-turut sebesar 25,6%, 24,18%, dan 29,28% dengan pemberian dosis ekstrak buah naga merah sebesar 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000mg/kgBB. Maka kami sebagai peneliti menggunakan dosis sebesar 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000mg/kgBB.

4.8.1.7 Prosedur Pemberian Ekstrak Buah Naga Merah pada Hewan Coba

Ekstrak buah naga merah diberikan per oral dengan sonde. Mulai hari ke-4 sampai ke-19 kebuntingan.

4.8.1.8 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Dilakukan mulai hari ke-4 sampai hari ke-19 kebuntingan. Sebanyak 1 batang rokok per hari selama 7,5 menit.

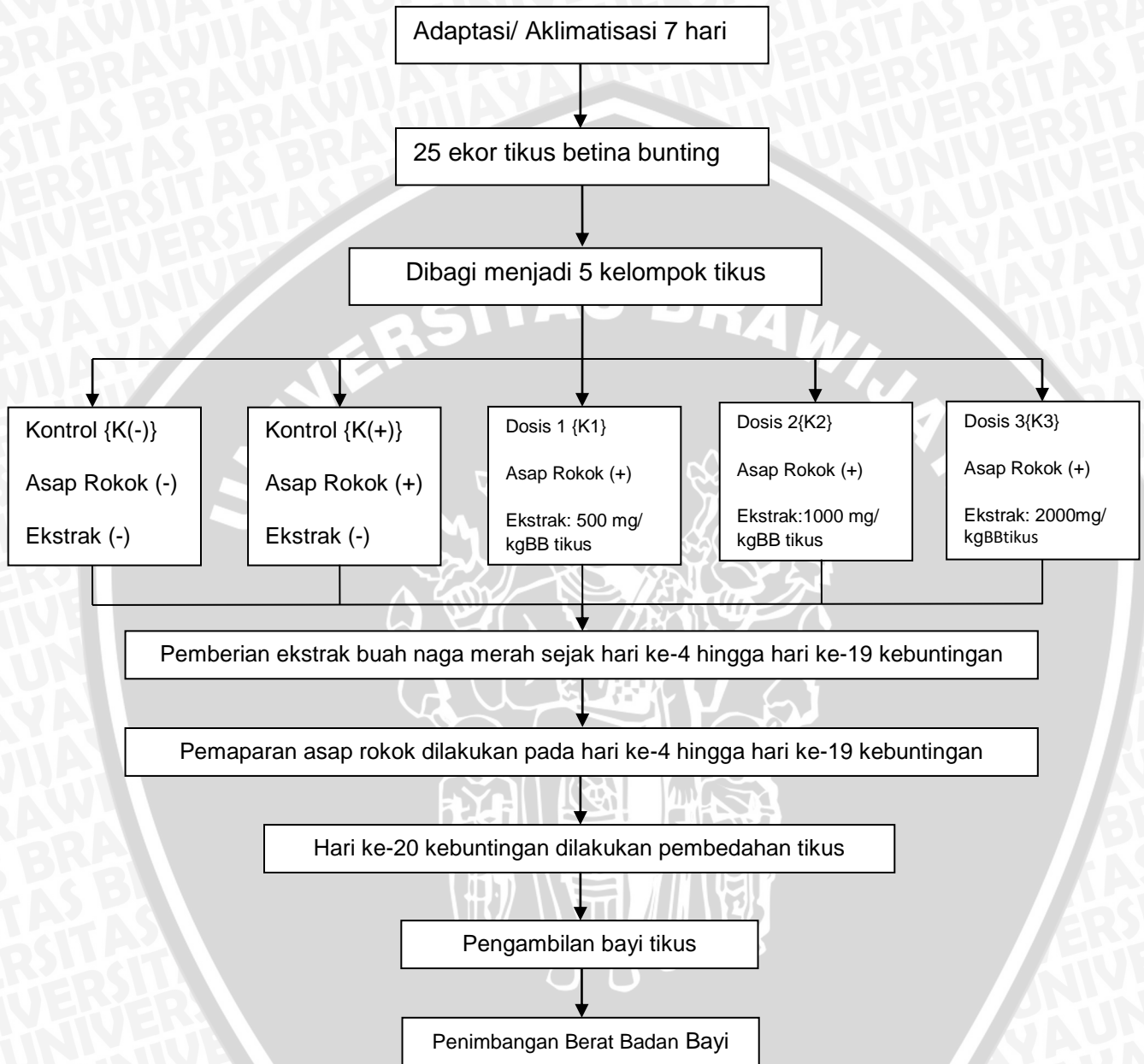
Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus adalah sebagai berikut (standar pemaparan asap rokok FKUB).

- a. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca ohaus sebelum dipapar asap rokok.
- b. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap.
- c. Nikotin yang melekat di smoking pump dibersihkan terlebih dahulu .
- d. Power dan *self voltage* diperiksa.
- e. Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah.
- f. Tiga ekor dimasukkan ke dalam kotak dan segera ditutup.
- g. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan dengan menjalankan pompa selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula.
- h. Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya.
- i. Pompa tetap dijalankan tanpa asap rokok untuk mengeluarkan sisa asap rokok.
- j. Tahap-tahap diatas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya.

4.8.1.9 Prosedur Pengambilan Bayi Tikus

Pada hari ke-20 tikus dibedah dan diangkat bayi tikus. Kemudian dilakukan penimbangan. Proses melahirkan dan penguburan tikus yang sudah tidak dipakai, dilakukan oleh petugas laboratorium.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Skema Pelaksanaan Penelitian

4.10 Teknik Analisa Data

Hasil perhitungan penimbangan berat badan tikus control dan perlakuan dianalisa secara statistic dengan menggunakan program *SPSS 12.0 for Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p < 0,05$). Langkah – langkah uji data adalah sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data: bertujuan untuk mengetahui apakah data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesa bergantung pada normal tidaknya distribusi data. Apabila data terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran data . sedangkan apabila data tidak terdistribusi. Normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesa jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
- b. Uji homgenitas varian: apabila varian dalam kelompok homogen, maka asumsi untuk menggunakan Anova telah terpenuhi.
- c. Uji One way Anova (Analisa varian satu arah): bertujuan untuk membandingkan nilai rata – rata dari masing – masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda yang signifikan.
- d. Post Hoc Test: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji Anova. Uji hoc yang digunakan adalah uji Tukey-HSD dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0.05$).

- e. Uji korelasi Pearson: untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji Post Hoc (Tukey-HSD).
- f. Uji regresi sederhana: untuk memprediksi berat badan bayi tikus tiap kenaikan satu satuan dosis ekstrak buah naga merah.

