

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) model DM dengan “*post test only control group design*”, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif dan negatif.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan Agustus 2015.

4.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Pemilihan Sampel

4.3.3.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan
2. Berat badan tikus 100-250 gram
3. Usia dewasa (3 bulan)
4. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.3.3.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati dalam masa penelitian.
2. Tikus mengalami diare selama penelitian berlangsung.

Penelitian ini membagi sampel dalam lima kelompok perlakuan, yaitu:

- a. Kelompok kontrol negatif (K (-)) : sampel tanpa kondisi DM dan tanpa paparan debu vulkanik.
- b. Kelompok kontrol positif (K (+)): sampel dengan kondisi DM tanpa paparan debu vulkanik (V_{DM}).
- c. Kelompok perlakuan I (P1) : sampel dengan kondisi DM dan paparan debu vulkanik dosis $6,25 \text{ mg/m}^3$ 1 jam/hari selama 28 hari.
- d. Kelompok perlakuan II (P2): sampel dengan kondisi DM dan paparan debu vulkanik dosis $12,5 \text{ mg/m}^3$ 1 jam/hari selama 28 hari.
- e. Kelompok perlakuan III (P3) : sampel dengan kondisi DM dan paparan debu vulkanik dosis 25 mg/m^3 1 jam/hari selama 28 hari.

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Berdasarkan rumus $p(n-1) \geq 15$, di mana p adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah sampel tiap perlakuan.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 5, yaitu 1 kelompok kontrol negative, 1 kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut: $5(n-1) \geq 15$; $n-1 \geq 3$; $n \geq 4$.

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 4 ekor tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 20 tikus. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah 1 tiap perlakuan menjadi 25 tikus.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan debu yaitu 6,25 mg/m³, 12,5 mg/m³, dan 25 mg/m³.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol total.

4.4.3 Definisi Operasional

a. Debu vulkanik : debu vulkanik berasal dari letusan gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur.

b. Pemaparan : pemaparan dilakukan dengan alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.

c. Diabetes Melitus : pembuatan tikus diabetes dilakukan dengan merusak pankreas melalui pemberian streptozotocin intraperitoneal dosis 55 mg/kgBB. Dalam penelitian ini tikus yang dinyatakan DM dilihat dari klinis: berat badan turun, polidipsi, poliuria, dan *gluco test*.

d. Kadar Kolesterol Total Darah : jumlah kolesterol total dalam darah yang dinyatakan dengan satuan mg/dl.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- Bahan Makanan Tikus: Confeed PAR-S, tepung terigu tinggi protein, air.
- Bahan paparan debu vulkanik: Debu vulkanik dari Gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur.

4.5.2 Instrumen Penelitian

a. Alat Pemeliharaan Hewan Coba

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat dan botol air. Alas kandang adalah sekam padi yang diganti setiap tiga hari. Penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

b. Alat Pembuatan Makanan Hewan Coba

Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, dan nampan.

c. Alat Pemapar Debu Vulkanik

Alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

d. Alat Pengambilan Sampel Serum

Syringe 1 ml, kapal alkohol, kapas iodine, gelas, endorf, alat sentrifuge, mikro pipet.

e. Alat untuk Mengukur Kadar Kolesterol Total

Tabung reaksi, pipet, dan spektrofotometer.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Adaptasi

Adaptasi hewan coba selama 2 minggu di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.6.2 Pembuatan Diet

Pembuatan diet normal dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa per ekor setiap hari adalah 40 gram yang terdiri dari campuran confeed

PAR-S, tepung terigu tinggi protein, dan air. Pembuatan ransum dilakukan setiap hari dengan ketentuan 40 gr/ekor dan dibentuk bulatan agar memperkuat tekstur pakan untuk ditimbang sisanya keesokan harinya.

4.6.3 Pembuatan Tikus Diabetes Melitus (Nurdiana, 1994)

Pembuatan tikus diabetes dilakukan dengan merusak pankreas melalui pemberian streptozotocin. Adapun langkahnya sebagai berikut:

1. Menimbang berat badan dan mengukur kadar glukosa darahnya.
2. Melarutkan streptozotocin dosis 55 mg/kgBB pada buffer sitrat 0,1 M sehingga pH larutan menjadi 4,5.
3. Menyuntikkan streptozotocin kepada tikus secara intraperitoneal.
4. Setelah tiga hari penyuntikkan streptozotocin dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dengan *gluco test*. Semua tikus dengan kadar glukosa darah puasa >200 mg akan digunakan dalam penelitian. Pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar glukosa dilakukan melalui pungsi vena ekor tikus.

4.6.4 Pemaparan Debu Vulkanik

Pemaparan debu vulkanik dilakukan dengan alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Debu vulkanik berasal dari letusan Gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur. Prinsip dari alat tersebut adalah menyediakan lingkungan ambien yang mengandung debu vulkanik yang dapat terinhalasi ke saluran nafas hewan coba. Aliran udara pada blower di alat tersebut adalah 1,5-2 liter/menit. Dosis paparan debu vulkanik dibuat secara bertingkat dengan lama paparan 1 jam per hari selama 28 hari (subkronik).

Pemaparan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.5 Pembiusan Hewan Coba

Pembiusan dilakukan pada kelompok K(-), kelompok K(+), dan kelompok P1, P2, dan P3 . Pembiusan dilakukan dengan anestesi injeksi ketamin 30 mg/kgBB intraperitoneal.

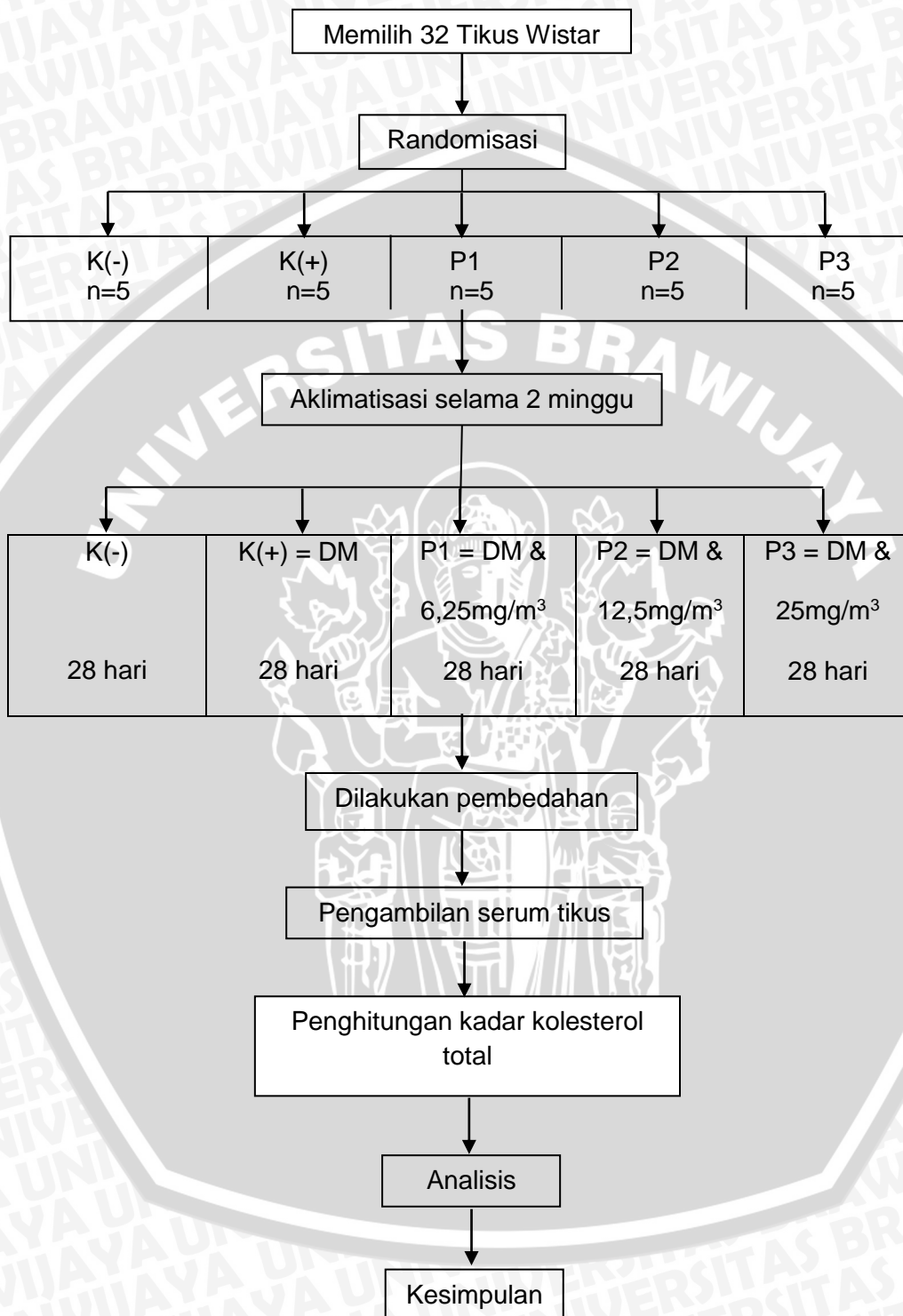
4.6.6 Pengambilan Sampel Darah Hewan Coba

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

4.6.7 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Hewan Coba (Riesanti, *et al.*, 2012)

Sampel darah tikus yang diambil dari jantung kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditunggu selama 30 menit-3 jam hingga keluar serunya. 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 total. Kadar kolesterol total ditentukan secara enzimatik dengan metode CHOD-PAP (*cholesterol oxidase-peroxidase aminoantipyrine phenol*) dan dinyatakan dengan satuan mg/dl. Prinsip metode ini adalah kolesterol dapat diubah menjadi partikel yang berwarna dan intensitasnya dapat diukur secara fotometrik.

4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian



Keterangan:

K (-) : Kontrol negatif

K (+) : Kontrol positif

P1 : Perlakuan 1

P2 : Perlakuan 2

P3 : Perlakuan 3

N : Jumlah sampel

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data**4.8.1 Pengumpulan Data**

Semua kelompok tikus setiap 4 hari ditimbang berat badannya agar peneliti mengetahui perkembangan berat badan tikus serta ditimbang sisa makanan tiap harinya. Pemaparan debu vulkanik dilakukan 1 jam per hari selama 28 hari. Kemudian tikus dimatikan sesuai dengan *ethical clearance*, dibedah, dan diambil darah dari jantung untuk diambil serumnya.

4.8.2 Analisa Data

Data mengenai pengaruh debu vulkanik terhadap kolesterol total serum tikus *wistar (Rattus norvegicus)* dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 17.0 dengan metode Uji statistika *Analysis of Variance (ANOVA) Oneway*. Hipotesis ditentukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh $>0,05$, sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh $<0,05$. H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh paparan debu vulkanik terhadap nilai kadar kolesterol total antar kelompok. Sedangkan H_1 adalah terdapat pengaruh debu vulkanik terhadap nilai

kadar kolesterol total antar kelompok. Sebelum melakukan analisa data dengan uji anova, maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji *One-way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji *One-way* ANOVA adalah populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varian dari populasi-populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain.

Hasil pengukuran kadar kolesterol total serum tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a. **Uji normalitas data:** bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan *median* dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
- b. **Uji homogenitas varian:** bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi yang normal.
- c. **Uji *One-way* ANOVA:** bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua

kelompok yang berbeda signifikan. Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan nilai kadar kolesterol total antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan jumlah kadar kolesterol yang signifikan antar kelompok. Perbedaan rata-rata kadar kolesterol total dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$, atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji ANOVA ini hipotesis Null yang diajukan adalah “Keempat kelompok mempunyai nilai kadar kolesterol total yang tidak sama”.

d. **Post Hoc Tukey Test (uji Honestly Significant Difference):** bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

e. **Uji korelasi Pearson:** untuk mengetahui apakah dosis paparan debu vulkanik berpengaruh terhadap kadar kolesterol total. Interval kekuatan korelasi menurut Jonathan Sarwono:

- 0 : tidak ada korelasi
- 0,00-0,25 : korelasi sangat lemah
- 0,25-0,50 : korelasi cukup
- 0,50-0,75 : korelasi kuat
- 0,75-0,69 : korelasi sangat kuat
- 1 : korelasi sempurna