

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan percobaan *Post Test Only Control Group Design* dengan hewan coba tikus *Ratus norvegicus* galur Wistar. Sebelum melakukan percobaan hewan coba diaklimatisasi selama 2 minggu tanpa diberi perlakuan khusus. Pengelompokan dan perlakuan dilakukan secara acak (*randomized*), dimana hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu :

- Kelompok kontrol negatif yaitu tikus normal (N)
- Kelompok paparan debu vulkanik dosis  $6,25 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari ( $V_A$ ).
- Kelompok paparan debu vulkanik dosis  $12,5 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari ( $V_B$ ).
- Kelompok paparan debu vulkanik dosis  $25 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari ( $V_C$ ).

## 4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah tikus *Ratus norvegicus* galur Wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Adapun kriteria inklusi sampel yang dipakai adalah sebagai berikut :

- Tikus *Ratus norvegicus* galur Wistar dengan jenis kelamin jantan
- Usia dewasa  $\pm$  3 bulan
- Berat badan 100-250 gram
- Tikus normal yang sehat dan bergerak aktif

Adapun kriteria eksklusi untuk dijadikan sampel adalah sebagai berikut :

- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- Tikus yang kondisinya menurun selama penelitian
- Tikus yang mati sebelum dipapar debu vulkanik selama 28 hari

Jumlah sampel untuk masing-masing perlakuan ditentukan dengan menggunakan rumus Freder (1977) berikut.

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

$$n (4-1) \geq 15$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

p = perlakuan

n = jumlah

15 = konstanta

Berdasarkan rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5, maka jumlah sampel yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 5 ekor tikus. Untuk menghindari hilangnya sampel selama periode penelitian akibat adanya kematian tikus, maka pada setiap kelompok ditambahkan 2 ekor tikus cadangan untuk perlakuan paparan dan 4 ekor untuk kontrol, sehingga terdapat 7 ekor tikus pada kelompok paparan (VA, VB, dan VC) dan 9 ekor tikus pada kelompok kontrol. Total sampel pada penelitian adalah 30 ekor tikus.

#### **4.3. Variabel Penelitian**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian paparan debu vulkanik sebanyak  $6,25 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari,  $12,5 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari,  $25 \text{ mg/m}^3$  selama 1 jam/hari.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar SGOT dan SGPT.

#### **4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa pemaparan debu vulkanik hingga pembedahan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan sampel darah menjadi serum dan analisis kadar SGOT dan SGPT dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian yaitu pada bulan Mei 2015 hingga Agustus 2015.

#### 4.5. Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1. Alat Penelitian

- Alat pemeliharaan hewan coba berupa kandang berupa bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari anyaman kawat,
- Botol air sebagai tempat minum hewan coba
- Rak tempat meletakkan kandang, sekam, dan penimbang berat badan.
- Alat pembuat pakan hewan coba berupa baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan.
- Alat pemapar debu *dust exposurer* yang terdapat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan volume 0,5 m<sup>3</sup>.
- Alat untuk pembedahan hewan coba berupa spuit, ketamin, pisau bedah, dan gunting.
- Alat untuk pengambilan dan penyimpanan darah berupa spuit 5 cc dan vacountainer non-EDTA.
- Alat pembuatan dan penyimpanan serum berupa sentrifugasi, pipet, tabung *effendorf*.
- Alat untuk analisis serum berupa reagen dan spektrofotometer *BioSystem*.

#### 4.5.2. Bahan Penelitian

- Bahan perawatan tikus berupa air, sekam, pakan tikus (Confeed PAR-S, tepung terigu tinggi protein, dan air). Jumlah makanan rata-rata 40 gram per hari untuk setiap tikus. Pemberian pakan dilakukan secara *ad libitum*.
- Debu vulkanik Gunung Kelud dengan dosis 6,25 mg, 12,5 mg, dan 25 mg yang sudah dikemas sebanyak 28 per dosis untuk paparan selama 28 hari.
- Bahan pembedahan tikus : ketamin dengan dosis 30 mg/kgBB

#### 4.6. Definisi Operasional

- Hewan coba adalah tikus *Ratus norvegicus* jantan galur Wistar, dengan bulu berwarna putih, sehat, bergerak aktif, tingkah laku normal, umur  $\pm$  3 bulan, berat 100-250 gram.
- Berat badan tikus adalah ukuran yang menggambarkan total jumlah komponen tubuh hewan coba termasuk jaringan dan cairan dalam berat satuan berat gram dan ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan tingkat ketelitian 0,1 gram.
- Debu vulkanik yang dipakai adalah debu vulkanik yang berasal dari Gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur yang telah dikelompokkan menjadi tiga kelompok dosis, antara lain 6,25 mg, 12,5 mg, dan 25 mg.
- Alat pemapar yang digunakan merupakan alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m<sup>3</sup> yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Prinsip dari alat tersebut adalah menyediakan lingkungan ambien yang mengandung debu vulkanik yang dapat terinhalasi ke saluran nafas hewan coba.

- Aliran udara pada blower *dust exposure* adalah 1,5-2 liter/menit. Kecepatan ini sesuai dengan kecepatan aliran udara di lingkungan pertambangan batubara.
- Lama paparan debu vulkanik adalah 1 jam per hari selama 28 hari (subkronik).
- Pemaparan debu dan pembedahan tikus dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, sedangkan sentrifugasi dan analisis serum untuk mengetahui nilai SGOT dan SGPT dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Serum Glutamin Oksalat Transaminase (SGOT) merupakan biomarker kimiawi dengan nilai normal 101,816 s/d 171,184 U/L. Serum Glutamin Piruvat Transaminase (SGPT) merupakan biomarker kimiawi dengan nilai normal 87,093 s/d 142,407 U/L (Adriani, *et al.*, 2014)
- Alat yang digunakan untuk mengukur kadar SGOT dan SGPT adalah spektrofotometer *BioSystem*.
- *Reagen* yang digunakan untuk analisis SGOT dan SGPT menggunakan *reagen kit* dari *BioSystem*.
- *Reagen* SGOT : Reagen A : Tris 121 mmol/L, L-aspartat 362 mmol/L, malat dehidrogenase > 460 U/L, laktat dehidrogenase > 660 U/L,

Sodium hidroksida 255 mmol/L, pH 7,8. Reagen B : NADH 1,9 mmol/L, 2-oksaloglutarat 75 mmol/L, Sodium hidroksida 148 mmol/L, Sodium azida 9,5 g/L.

- *Reagen* SGPT : Reagen A : Tris 150 mmol/L, L-alanin 750 mmol/L, Laktat dehidrogenase > 1350 U/L, pH 7,3. Reagen B : NADH 1,9 mmol/L, 2-oksaloglutarat 75 mmol/L, Sodium hidroksida 148 mmol/L, Sodium azida 9,5 g/L.

#### 4.7. Prosedur Penelitian

##### 4.7.1. Pembuatan Pakan Tikus

1. Tikus *Ratus norvegicus* strain Wistar didapatkan dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tikus dipelihara dalam kandang bak plastik dengan ventilasi terbuka, tutup kawat, dan alas berupa sekam padi. Pergantian sekam dilakukan tiga hari sekali.
2. Memberi label pada kandang tikus sesuai perlakuan yaitu label N untuk kontrol negatif,  $V_A$  untuk tikus dengan pemberian paparan debu  $6,25 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari,  $V_B$  dengan pemberian paparan debu  $12,5 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari, dan  $V_C$  dengan pemberian paparan debu  $25 \text{ mg/m}^3$  1 jam/hari selama 28 hari. Pemaparan debu vulkanik diberikan menggunakan pemapar debu *dust exposure* yang tersedia di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya.
3. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya. Lalu tikus dimasukkan ke dalam kandang secara random. Kandang terbuat dari bak

plastik dengan penutup kawat ram dan dibingkai dengan kayu. Alas berupa sekam yang diganti setiap 3 hari sekali. Kemudian, mengadaptasikan tikus selama 14 hari. Satu kandang terdiri dari 7-9 tikus.

4. Memberi minum air keran setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
5. Memberi makan berupa confeed PARS, tepung terigu tinggi protein dengan berat  $\pm$  40 gram.

#### 4.7.2. Pemaparan Debu Vulkanik

1. Mempersiapkan alat dan bahan berupa *dust exposurer* dan tiga kantung debu berisi tiga dosis debu yang berbeda, yaitu 6,25 mg, 12,5 mg, dan 25 mg.
2. Memasukkan 7 ekor tikus kelompok V<sub>A</sub> secara bersamaan ke dalam *dust exposurer* dan kemudian memasukkan debu dengan dosis 6,25 mg ke dalam alat pemapar.
3. Menyalakan alat dan menunggu alat memaparkan debu selama 1 jam.
4. Selanjutnya, memasukkan 7 ekor tikus kelompok V<sub>B</sub> secara bersamaan ke dalam *dust exposurer* dan kemudian memasukkan debu dengan dosis 12,5 mg ke dalam alat pemapar.
5. Menyalakan alat dan menunggu alat memaparkan debu selama 1 jam.

6. Selanjutnya, memasukkan 7 ekor tikus kelompok  $V_C$  secara bersamaan ke dalam *dust exposure* dan kemudian memasukkan debu dengan dosis 25 mg ke dalam alat pemapar.
7. Menyalakan alat dan menunggu alat memaparkan debu selama 1 jam.
8. Melakukan selama 28 hari.

#### 4.7.3. Pembedahan dan Pengambilan Serum

1. Setelah 28 hari, dilakukan pembedahan pada hewan coba untuk pengambilan sampel hewan coba.
2. Tikus dianestesi terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 30 mg/kgBB.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi *styrofoam*. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada *styrofoam*.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral sehingga organ-organ dalam rongga abdomen dan toraks terlihat. Pembedahan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dilakukan pengambilan darah tikus dari jantung tikus dengan menggunakan spuit 5 cc.
6. Darah lalu dimasukkan ke dalam vacountainer untuk disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

7. Setelah disentrifugasi, serum darah disimpan dalam tabung *effendorf* dan diambil dengan menggunakan pipet, lalu disimpan dalam tabung *effendorf* dan dilakukan analisis kadar SGOT dan SGPT menggunakan spektrofotometer BioSystem.

#### 4.7.4. Prosedur Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT

##### 4.7.4.1. Prosedur Pengukuran Kadar SGOT

1. Persiapan reagen : Menuangkan isi dari tabung reagen B ke tabung reagen A. Lalu, dicampurkan dengan hati-hati. Proporsi volume masing-masing reagen : 4 ml reagen A + 1 ml reagen B.
2. Reagen kerja dan alat disesuaikan dengan suhu reaksi.
3. Lalu mengambil reagen kerja sebanyak 1 ml untuk suhu 37°C dengan pipet , dan dipindahkan ke kuvet. Dan mengambil sampel yang akan dianalisis sebanyak 50  $\mu$ L.
4. Mencampur reagen kerja dan sampel yang akan dianalisa (serum). Lalu, menyalakan stopwatch.
5. Setelah 1 menit, absorbance awal direkam dan dengan interval 1 menit delta absorbance direkam dalam rentang waktu 3 menit.
6. Menghitung perbedaan antara hasil absorbance yang berurutan dan rata-rata perbedaan absorbance tiap menit ( $\Delta A/\text{min}$ ).

#### 4.7.4.2. Prosedur Pengukuran Kadar SGPT

1. Menuangkan isi dari tabung reagen B ke tabung reagen A. Lalu, dicampurkan dengan hati-hati. Proporsi volume masing-masing reagen : 4 ml reagen A + 1 ml reagen B.
2. Reagen kerja dan alat disesuaikan dengan suhu reaksi.
3. Lalu mengambil reagen kerja sebanyak 1 ml untuk suhu 37°C dengan pipet , dan dipindahkan ke kuvet. Dan mengambil sampel yang akan dianalisis sebanyak 50  $\mu$ L.
4. Mencampur reagen kerja dan sampel yang akan dianalisa (serum). Lalu, menyalakan stopwatch.
5. Setelah 1 menit, absorbansi awal direkam dan dengan interval 1 menit delta absorbance direkam dalam rentang waktu 3 menit.

#### 4.7.5. Perhitungan Kadar SGOT dan SGPT

##### 4.7.5.1. Perhitungan Kadar SGOT

Konsentrasi AST / SGOT pada sampel dihitung menggunakan rumus berikut ini :

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs} = U/L$$

Konsentrasi absorbansi molar ( $\epsilon$ ) dari NADH pada panjang gelombang 340 nm adalah 6300, light path (l) adalah 1 cm, Volum total reaksi (Vt) adalah 1,05 pada suhu 37°C dan 1,1 pada suhu 30°C, Volum sampel (Vs) adalah 0,05 pada 37°C dan 0,1 pada 30°C. Dan 1 U/L adalah 0,0166  $\mu$ kat/L. Rumus berikut ini disimpulkan untuk perhitungan dari konsentrasi katalitik :

$\Delta A/min$  x factor konversi pada tabel berikut ini sesuai suhu reaksi

	37 °C	30°C
$\Delta A/min$	x 3333 = U/L	x 1746 = U/L
	x 55.55 = $\mu$ kat/L	x 29.1 = $\mu$ kat/L

#### 4.7.5.2. Perhitungan Kadar SGPT

Konsentrasi ALT / SGPT pada sampel dihitung menggunakan rumus berikut ini :

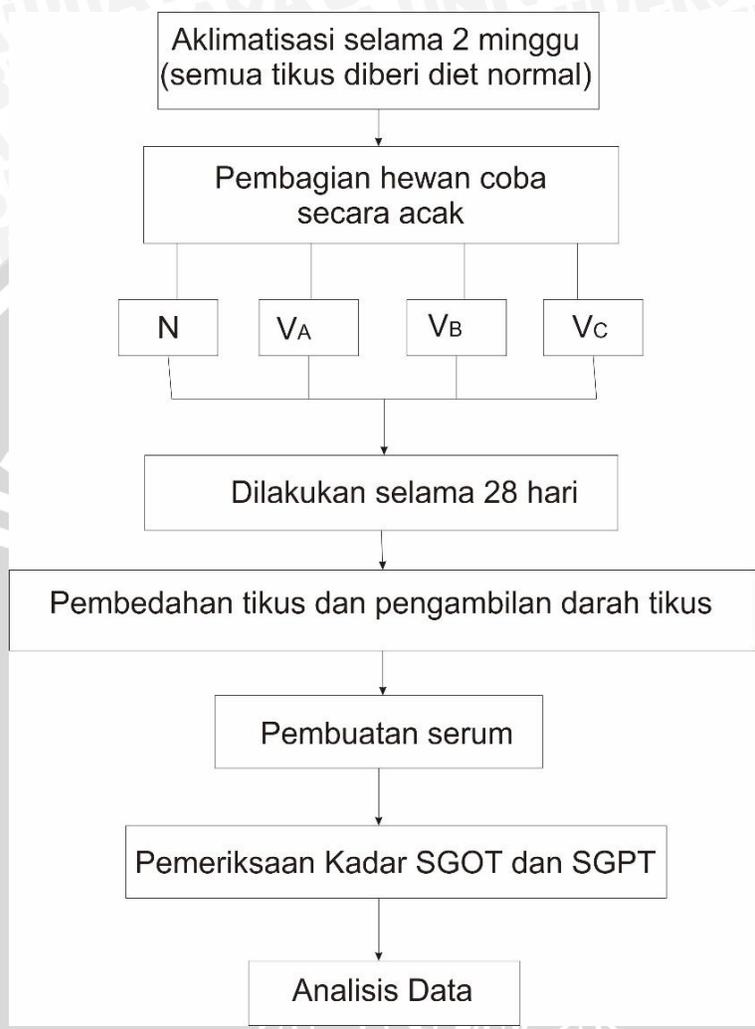
$$\Delta A/ \text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs} = U/L$$

Konsentrasi absorbansi molar ( $\epsilon$ ) dari NADH pada panjang gelombang 340 nm adalah 6300, light path (l) adalah 1 cm, Volum total reaksi (Vt) adalah 1,05 pada suhu 37°C dan 1,1 pada suhu 30°C, Volum sampel (Vs) adalah 0,05 pada 37°C dan 0,1 pada 30°C. Dan 1 U/L adalah 0,0166  $\mu$ kat/L. Rumus berikut ini disimpulkan untuk perhitungan dari konsentrasi katalitik :

$\Delta A/min$  x factor konversi pada tabel berikut ini sesuai suhu reaksi

	37 °C	30°C
$\Delta A/min$	x 3333 = U/L	x 1746 = U/L
	x 55.55 = $\mu$ kat/L	x 29.1 = $\mu$ kat/L

4.7.6. Alur Penelitian



Gambar 4.1. Bagan Skematik Rancangan Penelitian

Keterangan :

N	: kelompok kontrol negatif (normal)	: 9 ekor
VA	: kelompok paparan debu vulkanik dengan dosis 6,25 mg/m <sup>3</sup>	: 7 ekor
VB	: kelompok paparan debu vulkanik dengan dosis 12,5 mg/m <sup>3</sup>	: 7 ekor
VC	: kelompok paparan debu vulkanik dengan dosis 25 mg/m <sup>3</sup>	: 7 ekor

#### 4.8. Analisis Data

Data kadar SGOT dan SGPT serum tiap kelompok perlakuan dianalisis secara statistic dengan menggunakan software SPSS untuk uji normalitas dan *One Way ANOVA* dan minitab untuk uji homogenitas. Untuk mengetahui perbedaan rata-rata kadar SGOT dan SGPT serum antara kelompok kontrol dengan perlakuan digunakan uji *One Way ANOVA* untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok, serta dilanjutkan uji *Tukey* dan *Duncan* apabila hasil signifikan mengetahui bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda signifikan. Uji normalitas (uji *Kolmogorov smirnov*) bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki sebaran yang normal. Jika sebaran data normal, analisis dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Jika sebaran tidak normal analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji homogenitas varian bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varian homogen, dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Jika varian tidak homogen, dilanjutkan dengan uji non parametrik. Uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok, serta mengetahui bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda signifikan. Uji *Tukey* dan *Duncan* dilakukan setelah uji *One Way ANOVA* apabila hasil uji *One Way ANOVA* signifikan, yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana yang paling berpengaruh.

H0 : Tidak terdapat peningkatan kadar SGOT dan SGPT tikus strain Wistar pada paparan debu vulkanik selama periode sub kronik (28 hari).

H1 : Terdapat peningkatan kadar SGOT dan SGPT tikus strain Wistar pada paparan debu vulkanik selama periode sub kronik (28 hari).

