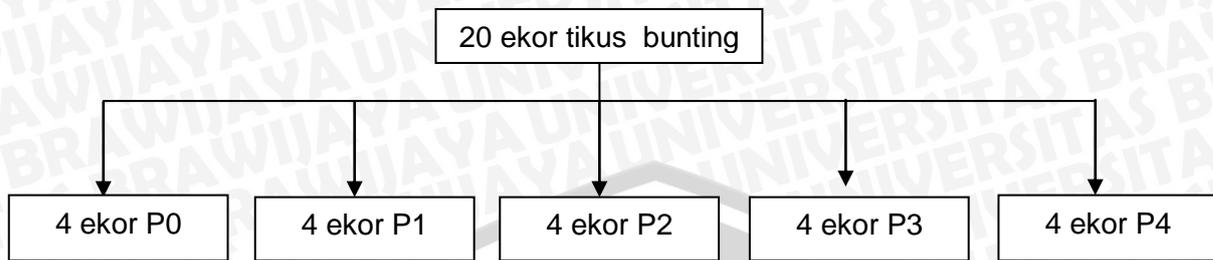


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Grup design* dimana subjek dibagi menjadi 5 kelompok (1 sampai dengan 5) secara random. Tiap kelompok terdiri dari 4 tikus bunting. Kelompok kontrol negatif (P0) adalah tikus bunting tanpa paparan asap rokok dan tanpa pemberian vitamin E. Kelompok kontrol positif (P1) adalah tikus bunting yang dipapar asap rokok tanpa pemberian vitamin E. Kelompok 1 – 3 adalah kelompok perlakuan, dipapar asap rokok dan diberikan vitamin E dengan dosis berbeda per oral dengan sonde. Pemberian vitamin E pada hari ke-1 kebuntingan, sedangkan pemaparan asap rokok dilakukan secara subakut dimulai hari ke-6 kebuntingan. Perlakuan dihentikan pada hari ke-20 kebuntingan sekaligus pembedahan tikus untuk pengambilan bayi tikus. Kemudian diobservasi dan dibandingkan efek pemberian vitamin E terhadap berat badan rata-rata pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Tikus yang dipilih adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina berusia minimal 8 minggu, telah siap kawin dan belum pernah melahirkan.



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- P0 = Kelompok kontrol negatif : tanpa pemaparan asap rokok dan tanpa vitamin E
 P1 = Kelompok kontrol positif : pemaparan asap rokok, tanpa vitamin E
 P2 = pemaparan asap rokok dengan vitamin E 100 mg/kgBB/hari
 P3 = pemaparan asap rokok dengan vitamin E 200 mg/kgBB/hari
 P4 = pemaparan asap rokok dengan vitamin E 400 mg/kgBB/hari

4.2 Besar Sampel dan Replikasi

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 4 kali replikasi untuk masing – masing kelompok. Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor tikus bunting sebagai sampel untuk masing – masing kelompok sehingga besar sampel secara keseluruhan adalah 20 ekor.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin tikus : betina
- b. Berat badan tikus : 200-250 gram
- c. Umur tikus : 8 minggu – 9 minggu
- d. Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata yang jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih
- e. Bunting

4.2.2 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi FKUB Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

- a. Pemaparan asap rokok subakut
- b. Pemberian vitamin E dalam 3 dosis

4.4.2 Variabel Tergantung

Berat badan rata-rata bayi tikus lahir aterm

4.5 Definisi Operasional

a. Tikus bunting

Tikus bunting adalah tikus betina yang telah dikawinkan dengan tikus jantan dan memperlihatkan tanda-tanda kebuntingan yakni terdapat sumbat vagina (*vaginal plaque*) (Malole dan Pramono 1989). Usia kebuntingan dihitung sebagai hari ke-1 pada saat muncul sumbat vagina sampai hari ke-20.

b. Asap rokok subakut

Asap rokok subakut adalah paparan asap rokok selama 14 hari yang dimulai pada hari ke-6 kebuntingan sampai hari ke-19 yang dipaparkan memakai peralatan *smooking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Paparan asap rokok diberikan satu batang perhari (Widodo, 2011).

c. Vitamin E

Vitamin E yang digunakan adalah vitamin E murni yang didapat dalam bentuk tablet dari merk *Natur E*. Tiap kapsul mengandung 100 IU vitamin E. Vitamin E tersebut disedot dengan menggunakan *sputit* dan diberikan peroral menggunakan sonde pada kelompok tikus hamil yang berbeda dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB/hari selama 19 hari mulai dari hari pertama kebuntingan sampai hari ke-19 (Tome, 2010).

d. Berat badan rata-rata bayi tikus

Berat badan tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah berat badan bayi tikus dibagi jumlah bayi tikus untuk diambil rata-ratanya.

4.6 Bahan Penelitian

4.6.1 Bahan Pemeliharaan Hewan Coba

Makanan hewan coba adalah makanan ternak (lampiran 1) dan minuman hewan coba adalah air keran.

4.6.2 Bahan Perlakuan Hewan Coba

a. Rokok

Asap rokok yang dipaparkan berasal dari rokok merek *Sampoerna*.

b. Vitamin E

Natur E yang tersedia di pasaran

c. Minyak wijen

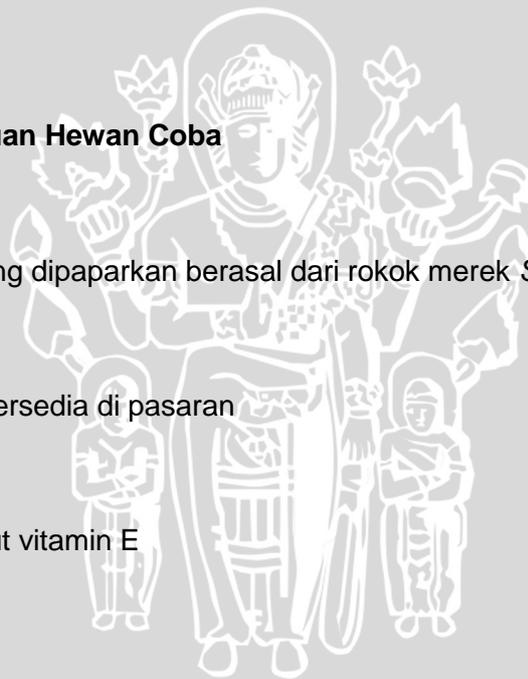
Sebagai pelarut vitamin E

4.6.3 Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

Eter

4.7 Alat Penelitian

4.7.1 Alat Pemeliharaan Hewan Coba



- a. Kandang tikus yang berupa box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm sebanyak 5 buah diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa. Masing – masing kandang ditempati 4 tikus bunting.
- b. Tempat minum

4.7.2 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Berat tikus ditimbang dengan menggunakan neraca *Ohaus*.

Berat badan bayi tikus ditimbang dengan menggunakan neraca *Ohaus*

4.7.3 Alat Untuk Pemberian Vitamin E Pada Hewan Coba

- a. Spuit 1 mL
- b. Sonde yang dapat dimasukkan ke dalam mulut sampai lambung tikus

4.7.4 Alat Untuk Pemaparan Asap Rokok Pada Hewan Coba

Untuk pemaparan asap rokok pada hewan coba, alat yang digunakan adalah *smoking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Alat ini berupa kotak yang dibuat dari *fiberglass*, terdiri dari tiga ruangan yang masing – masing berukuran 26 x 12 x 12 cm³. Di dalam setiap ruangan terdapat pipa untuk mengalihkan asap rokok. Ketiga pipa keluar menyatu dengan pipa yang dipasang rokok. Bagian lain dari alat ini adalah pompa yang berfungsi menghisap asap rokok dan bekerja dibantu dengan adaptor. Kemudian terdapat dua klep yang dapat terbuka dan tertutup secara otomatis saat penghisapan dan penutupan asap rokok keluar atau masuk kotak (Widodo, 2006).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Cara Kerja

4.8.1.1 Aklimatisasi Hewan Coba

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

4.8.1.2 Prosedur Penghamilan Hewan Coba

Waktu kawin tikus dilakukan pada fase estrus yang ditandai dengan keinginan untuk kawin dan penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk kopulasi. Fase ini berlangsung kira-kira 12 jam dan biasanya lebih sering terjadi pada malam hari daripada siang hari. Jika telah timbul tanda estrus, maka tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan. Pengawinan dilakukan dengan mencampurkan hewan jantan dan betina dengan perbandingan 1:4 dalam satu kandang. Tikus jantan dimasukkan ke kandang tikus betina pada pukul empat sore dimana sekam pada kandang betina dibersihkan agar memudahkan mengamati *vaginal plaque*. Keesokan harinya pada pukul 05.00 pagi dilakukan pengecekan, apabila ditemukan *vaginal plaque*, maka hari tersebut dihitung sebagai hari pertama kebuntingan. Tikus yang telah hamil diberi label (*permanent board marker*) pada ekor kemudian dimasukkan kedalam kelompok yang telah ditentukan dan selanjutnya akan mendapat perlakuan, sedangkan yang belum hamil dicampur kembali dengan tikus jantan (Arifin, 2007 dan Samsuria, 2009). Metode pembuntingan lainnya adalah menggunakan perbandingan satu jantan dan satu betina (1:1).

4.8.1.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dengan rincian sebagai berikut :

1. Kelompok Kontrol:
 - a. Negatif : tanpa dipapar asap rokok subakut dan tanpa diberi vitamin
 - b. Positif : dipapar asap rokok subakut tanpa diberi vitamin E
2. Kelompok Perlakuan:
 - a. Perlakuan 1 : dipapar asap rokok subakut diberi vitamin E dosis 100 mg/kgBB/hari
 - b. Perlakuan 2 : dipapar asap rokok subakut diberi vitamin E dosis 200 mg/kgBB/hari
 - c. Perlakuan 3 : dipapar asap rokok subakut diberi vitamin E dosis 400 mg/kgBB/hari

4.8.1.4 Penentuan Dosis Vitamin E

Dosis vitamin E untuk tikus 200 mg/kg/hari (Tome, 2010). Penentuan dosis berdasarkan deret ukur adalah sebagai berikut (Harmita, 2008):

$$\text{Rumus : } Y_N = Y_1 \times R^{N-1}$$

Y_N : Dosis ke-n

N : Kelompok ke-

R : Faktor geometris $\neq 0$ atau 1 kelipatan dosis. Diketahui dalam perhitungan ini faktor geometrisnya adalah 2.

Ditentukan dosis I = 100 mg/kgBB/hari

Maka dosis II

$$Y_2 = 100 \times 2^{2-1}$$

$$= 200 \text{ mg/kgBB/hari}$$

Dosis III

$$Y_3 = 100 \times 2^{3-1}$$

$$= 400 \text{ mg/kgBB/hari}$$

(Harmita, 2008)

Sehingga untuk menentukan jumlah vitamin E yang diberikan bisa dilakukan penghitungan seperti berikut:

Dosis I

$$\text{Kebutuhan vitamin E} = 100 \text{ mg/kg/hari}$$

$$\text{Berat badan tikus} = 0.25 \text{ kg}$$

$$\text{Dosis vitamin E tikus} = 100 \times 0,25 = 25 \text{ mg/hari}$$

$$= 22.73 \text{ IU}$$

$$= 23 \text{ IU}$$

Dosis II

$$\text{Kebutuhan vitamin E} = 200 \text{ mg/kg/hari}$$

$$\text{Berat badan tikus} = 0.25 \text{ kg}$$

$$\text{Dosis vitamin E tikus} = 200 \times 0,25 = 50 \text{ mg/hari}$$

$$= 45.45 \text{ IU}$$

$$= 46 \text{ IU}$$

Dosis III

$$\text{Kebutuhan vitamin E} = 400 \text{ mg/kg/hari}$$

$$\text{Berat badan tikus} = 0.25 \text{ kg}$$

$$\text{Dosis vitamin E tikus} = 400 \times 0,25 = 100 \text{ mg/hari}$$

$$= 90.90 \text{ IU}$$

= 91 IU

Ket :

- 1 IU = 1,1 mg d-alpha-tokoferol.

Vitamin E untuk 4 ekor tikus selama 10 hari $23 \times 4 \times 10 = 920$ IU, jumlah ini setara dengan 9,2 kapsul dan dibulatkan menjadi 10 kapsul *natur E*. Untuk mempermudah penyondean, vitamin E diencerkan menggunakan minyak wijen sampai volume 1 ml/tikus/hari. Oleh karena itu untuk kebutuhan tikus selama 10 hari adalah $1 \text{ ml} \times 4 \text{ tikus} \times 10 \text{ hari} = 40 \text{ ml}$ maka 10 kapsul vitamin E diencerkan dengan minyak wijen sampai volume akhir yang didapatkan adalah 40 ml (Standart Laboratorium Farmakologi FKUB).

Dosis II (200 mg/kg/hari) dibuat dengan mengencerkan 20 kapsul *natur E* dengan minyak wijen sampai volume akhir yang didapatkan adalah 40 ml. Sedangkan untuk Dosis III (400 mg/kg/hari) dibuat dengan mengencerkan 40 kapsul *natur E* dengan minyak wijen sampai volume akhir yang didapatkan 40 ml (Standart Laboratorium Farmakologi FKUB).

4.8.1.5 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama satu minggu pada temperatur ruangan konstan. Untuk tempat pemeliharaan digunakan box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm, masing-masing untuk 4 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam yang diganti dalam 2x /minggu. Porsi makanan tikus adalah 50g/hari/ekor.

4.8.1.6 Prosedur Pemberian Vitamin E pada Hewan Coba

Vitamin E diberikan mulai hari ke-1 sampai hari ke-19 kebuntingan setiap pukul 12.00 WIB. Vitamin E dimasukkan dalam spuit 1 mL yang telah dipasang sonde, kemudian sonde dimasukkan peroral hingga mencapai lambung tikus.

4.8.1.7 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan asap rokok subakut dilakukan pada hari ke-6 hingga hari ke-19 kebuntingan setiap pukul 16.00 WIB. Prosedur pemaparan asap rokok pada tikus adalah sebagai berikut (standar pemaparan asap rokok laboratorium Farmakologi 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, karena pada *smoking pump* hanya tersedia tiga ruangan.
- 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 rokok untuk mengeluarkan sisa asap
- j. Tahap-tahap di atas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya.

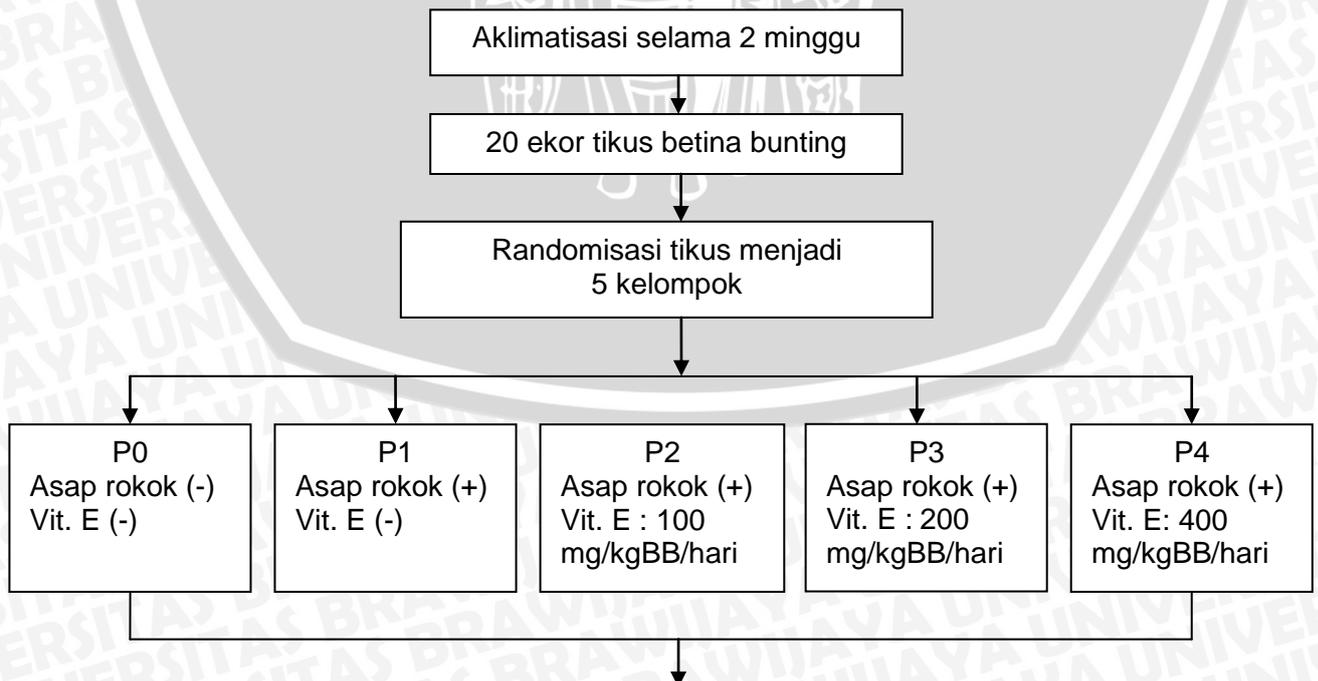
4.8.1.8 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Bayi Tikus

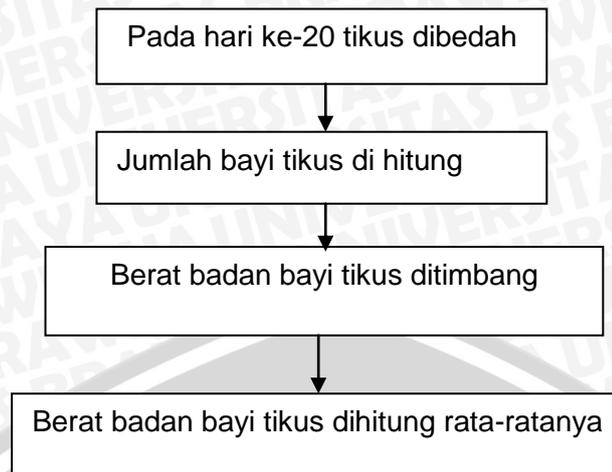
Tikus dianestesi sebelum dibedah dengan cara dimasukkan ke dalam kotak berisi eter. Tikus dibiarkan lemas, kemudian dibedah dan plasenta serta bayi tikus diambil dan dipisahkan (Samsuria, 2009). Kemudian setelah bayi tikus ditimbang bangkai induk dan anak tikus yang sudah tidak digunakan dikubur dengan aman oleh petugas laboratorium.

4.8.1.9 Prosedur Penimbangan bayi tikus

Bayi tikus dan plasenta dipisahkan menggunakan gunting bedah kemudian seluruh bayi tikus ditimbang menggunakan neraca Ohaus Lab. Farmakologi FKUB.

4.8.2 Alur Penelitian





4.9 Analisis Data

Data hasil penimbangan berat badan bayi tikus kontrol dan tikus perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat kepercayaan 99% ($p = 0,01$).

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 hipotesis 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 berdistribusi 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 : 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 signifikan.

- d. *Post Hoc test* : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji Anova, yaitu uji *post hoc HSD Tukey* 5%.
- e. Uji *Kruskall Wallis* : merupakan uji non-parametrik untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan hasil jumlah bayi pada masing-masing kelompok perlakuan. Uji ini dilakukan jika data tidak memenuhi syarat untuk di uji *one way anova*.
- f. Uji korelasi: bertujuan untuk mengetahui ada tidanya hubungan antara dua variabel yaitu antara jumlah bayi dengn bar badan rata-rata bayi lahir aterm.

