

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* pada hewan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina yang sedang bunting dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif dan negatif.

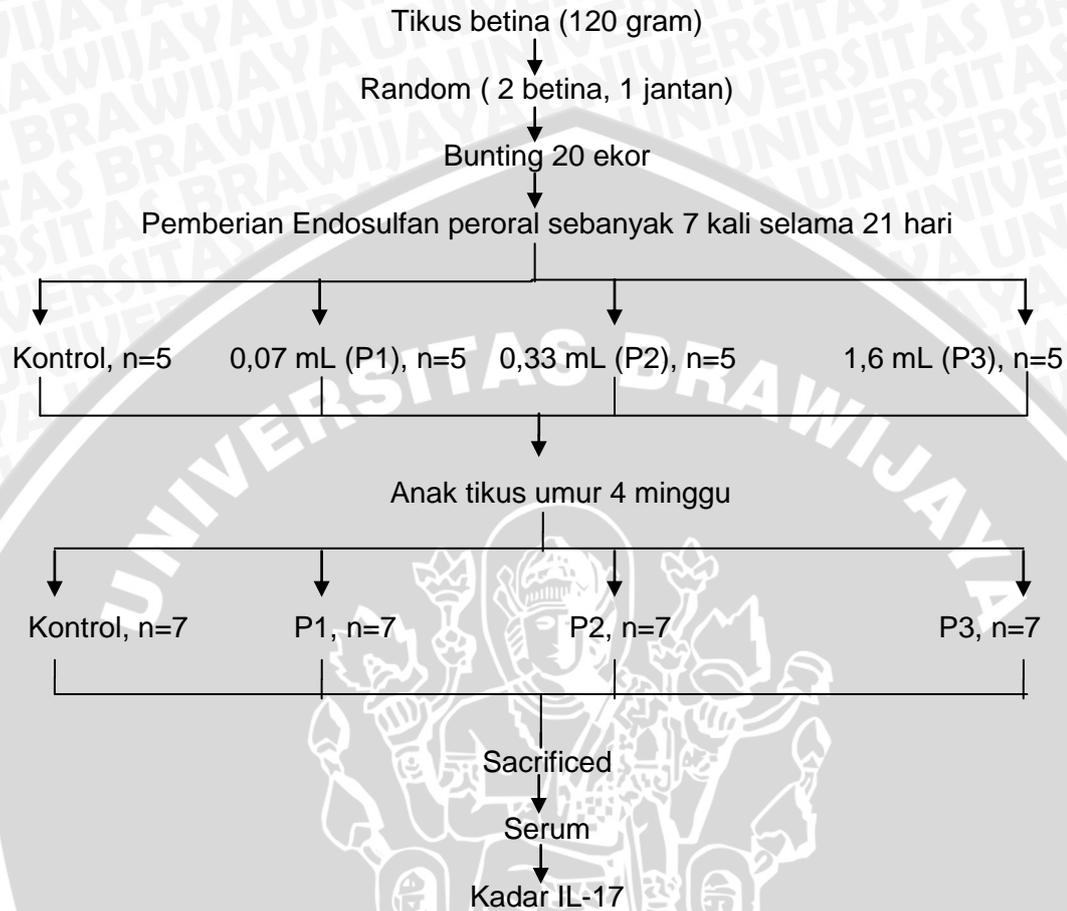
Perbandingan dosis antara kelompok perlakuan I : II : III = 1 : 10 : 50, dengan endosulfan yang tersedia adalah 2 ml maka didapatkan dosis endosulfan yang diberikan adalah:

- Kontrol negatif: 0 ml
- Perlakuan I: 1 → $1/61 \times 2\text{ml} : 0.07\text{ml}$
- Perlakuan II: 10 → $10/61 \times 2\text{ml} : 0.33\text{ml}$
- Perlakuan III: 50 → $50/61 \times 2\text{ml} : 1.6\text{ml}$

Pemberian dosis endosulfan ini dibagi dalam 4 kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan dan minyak zaitun)
2. Kelompok II (Perlakuan 1): hewan coba diberi paparan endosulfan 0.07mL
3. Kelompok III (Perlakuan 2): hewan coba diberi paparan endosulfan 0.33mL
4. Kelompok IV (Perlakuan 3): hewan coba diberi paparan endosulfan 1.6mL

Alur penelitian ini adalah sebagai berikut:



4.2 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian diambil secara *Purposive Sampling*, dengan restriksi sebagai berikut:

1. Jenis tikus: tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar betina
2. Umur tikus: 8 minggu
3. Berat badan tikus: 120 gram
4. Jenis kelamin tikus: betina

Karena dalam penelitian ini terdapat 4 jenis perlakuan, maka jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan ru-

mus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Solimun, 2001). Dari rumus tersebut, jika jumlah perlakuan adalah 4, maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan adalah sebanyak 5, yang diperoleh dari penghitungan sebagai berikut:

$$[(np-1) - (p-1)] \geq 16$$

$$[(4n-1) - (4-1)] \geq 16$$

$$(4n-1) - 3 \geq 16$$

$$4n-4 \geq 16$$

$$4n \geq 20$$

$$n \geq 5$$

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan juli-oktober 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis endosulfan yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol (tikus yang tidak diberi paparan endosulfan dan minyak zaitun)
2. Kelompok II: tikus yang diberikan paparan endosulfan 0.07 ml
3. Kelompok III: tikus yang diberikan paparan endosulfan 0.33 ml
4. Kelompok IV: tikus yang diberikan paparan endosulfan 1.6 ml

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar IL-17 pada tikus yang dipapar endosulfan.

Variabel perancu (*confounding factors*) pada penelitian ini meliputi:

- a. Dapat dikendalikan :
 1. Spesies tikus
 2. Umur tikus
 3. Suhu ruangan
 4. Infeksi sekunder
 5. Stres tikus
 6. Ketelitian pengamatan
- b. Tidak dapat dikendalikan :
 1. Variasi genetik
 2. Metabolisme tikus

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina yang sedang bunting, berusia 8 minggu, memiliki berat badan antara 120-150 gram dan anak tikus putih yang berusia 4 minggu.
2. Endosulfan: endosulfan diberikan dengan dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan intubasi oral selama sebanyak 7 kali pada masa kebuntingan 6 sampai 21 hari.
3. Kadar IL-17: merupakan salah satu biomarker dari gejala inflamasi. Peningkatan ini di ukur dengan menggunakan ELISA kit.

4.6 Bahan dan Alat

1. Perawatan Tikus

Alat: bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 24 buah, botol air 24 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca sartorius.

2. Pembuatan Pakan Normal

Alat: timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan.

Bahan: Comfeed PARS 53% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, Ca 1,1%, fosfor 0,9%, coccidiostat 53%), tepung terigu 23,5%, dan air 23,5%.

2. Induksi Endosulfon

Bahan: endosulfan dan minyak zaitun.

3. Pengambilan serum darah tikus

Alat: spuit 3 mL, spuit 5 mL, centrifuge, centrifuge tube 15 mL, centrifuge tube 50 mL, microcentrifuge tube 1,5 mL.

5. Pengecekan Kadar IL-17

Alat: IL-17 ELISA kit

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Adaptasi

Selama proses adaptasi, semua kelompok tikus diberi pakan standart (normal) yang terdiri dari comfeed PARS, tepung terigu, dan air. Masing-masing tikus mendapatkan 40 gram dari campuran bahan tersebut dan diberikan secara *ad libitum*.

4.7.2 Proses Perlakuan pada Tikus

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan tikus betina (120-150 g) strain Wistar, diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. Semua tikus dipelihara sesuai dengan kondisi standar. Semua prosedur eksperimental dilakukan sesuai dengan pedoman dari Komite Etika Hewan Program Studi Kedokteran Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Setelah periode aklimatisasi satu minggu, tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan dari strain yang sama. Setelah kawin, tikus betina secara individual ditempatkan di kandang polypropylene. Tikus bunting ditimbang dan terdistribusi secara acak menjadi empat kelompok dan diperlakukan sebagai berikut:

- Kelompok I, kontrol (tanpa pemberian endosulfan dan minyak zaitun),
- Kelompok II, pemberian endosulfan (0.07 mL),
- Kelompok III, pemberian endosulfan (0.33 mL),
- Kelompok IV, pemberian endosulfan 1.6 mL).

Endosulfan diberikan dengan dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan intubasi oral pada usia kehamilan 6 sampai 20 hari (Singh *et al.*, 2012). Endosulfan diberikan sebanyak 7 kali pemberian pada masa kehamilan. Setelah 30 hari tikus betina melahirkan, anak tikus dikorbankan. Serum darah anak tikus diambil untuk dilakukan pengukuran kadar IL-17.

4.7.3 Pengukuran Kadar IL-17

Metode pengukuran kadar IL-17 merujuk pada human IL-17 ELISA Kit. Bahan dan standart ditempatkan ke dalam suhu ruang. 100 µL standard, Standart, blank dan sampel dilarutkan dalam dilution dan ditempatkan ke dalam tabung kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu ruang. Suspensi dicuci sampai 4 kali dengan PBS. Konjugat ditambahkan sebanyak 200 µL disetiap

tabung. Jika sampel berupa serum akan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Suspensi dicuci dengan buffer pencuci sampai 4 kali kemudian ditambahkan 200 μ L larutan substrat pada setiap tabung dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Stop solution ditambah pada setiap tabung dan dibaca 450 nm selama 30 menit dan dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

4.8 Pengolahan Data

Data yang terkumpul akan diedit, dikoding, dimasukkan ke dalam file komputer. Kemudian dilakukan analisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0 for Windows XP dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p= 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Dari data pengamatan dan pengukuran dilakukan dengan analisa varian (ANOVA), uji *Post hoc* dan uji *Pearson correlation*. Langkah-langkah uji hipotesis korelatif adalah sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data,
- b. Uji homogenitas varian
- c. Uji *one way*-Anova
- d. Uji korelasi-regresi