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.

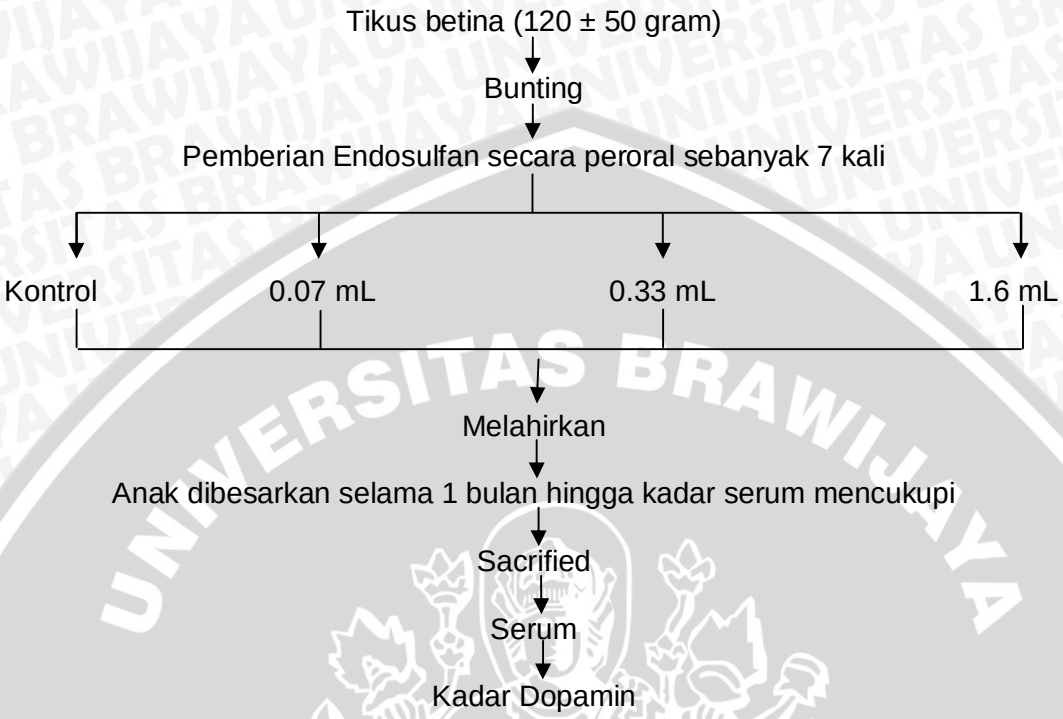
Perbandingan dosis antara kelompok perlakuan I : II : III = 1 : 10 : 50, dengan endosulfan maka didapakan dosis endosulfan yang diberikan adalah:

- Kontrol negatif : 0 ml
- Perlakuan I : 1 → 1/61 x 2ml : 0.07ml
- Perlakuan II : 10 → 10/61 x 2ml : 0.33ml
- Perlakuan III : 50 → 50/61 x 2ml : 1.6ml

Pemberian dosis endosulfan ini dibagi dalam 4 kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan)
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 endosulfan1.6mL

Alur penelitian ini adalah sebagai berikut:



4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya.Hewan coba dalam penelitian ini dipelihara di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Teknik Sampling

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 yang sedang bunting.
2. Umur tikus : 8 minggu.

3. Berat badan tikus : 120-150 gram.
4. Jenis kelamin tikus : betina.

4.2.3 Estimasi Jumlah Sampel

Karena dalam penelitian ini terdapat 4 jenis perlakuan, maka jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus [(np-1) – (p-1)] ≥ 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)] ≥ 16

[(4n-1) - (4-1)] ≥ 16

(4n-1) - 3 ≥ 16

4n-4 ≥ 16

4n ≥ 20

n ≥ 5

4.3 Tempat 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

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Pemberian dosis endosulfan yang dibagi dalam 4 kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan).
2. Kelompok II: hewan coba yang diberikan paparan endosulfan 0.07mL

3. Kelompok III: hewan coba yang diberikan paparan endosulfan 0.33mL
4. Kelompok IV: hewan coba yang diberikan paparan endosulfan 1.6mL

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Kadar dopamin serum pada tikus yang induknya dipapar endosulfan saat kehamilan periode organogenesis.

4.4.3 Variabel Perancu (*Confounding Factors*) Penelitian

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 hamil.
2. Induksi endosulfan: Endosulfan diberikan dengan dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan penyondean oral (Singh *et al.*, 2011) diberikan sebanyak 7 kali pada masa organogenesis, yaitu antara hari ke 6-14 masa kehamilan (Hery *et al.*, 2007)

3. Pengambilan darah tikus: Anak tikus putih dibius menggunakan ketamin. Selanjutnya, thoraks tikus dibedah dan darah langsung diambil dari jantung sebanyak 2 cc.
4. Pemeriksaan kadar dopamin: Pemeriksaan serum darah tikus putih menggunakan Dopamin ELISA Kit.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

1. Perawatan tikus

   Alat : Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, makanan tikus, 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%.
3. Induksi Endosulfan

   Endosulfan diberikan dengan cara dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan intubasi oral (Singh *et al*., 2011) diberikan sebanyak 7 kali pada masa organogenesis yaitu antara hari ke 6-14 masa kehamilan (Hery *et al*., 2007).
4. Pengambilan serum darah tikus

   Alat: Spuit 3 mL, spuit 5 mL, mikroskop binokuler, vortex, centrifuge, cover glass, object glass, centrifuge tube 15mL, centrifuge tube 50mL, microcentrifuge tube 1,5 mL.

5. Pengecekan Kadar dopamin

   Alat: Dopamin ELISA Kit.

4.7 Metode Pengumpulan Data

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*. Tikus induk betina dibuntingkan.

4.7.2 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan tikus betina (120 ± 50 g) 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. Setiap hari dilakukan pengecekan kehamilan pada tikus betina. Pengecekan ini di lakukan pada kandang khusus yang dapat menampung urin selanjutnya menggunakan alat tes kehamilan, dan juga dengan melihat bercak sperma di bagian alat kelamin betina. Setelah hamil, tikus betina secara individual ditempatkan di kandang. Tikus bunting ditimbang dan terdistribusi secara acak menjadi empat kelompok dan diperlakukan sebagai berikut:

- Kelompok I, kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan)
- Kelompok II, hewan coba diberi paparan endosulfan 0.07ml
- Kelompok III, hewan coba diberi paparan endosulfan 0.33ml

- Kelompok IV, hewan coba diberi paparan endosulfan 1.6ml

Endosulfan diberikan dengan cara dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan intubasi oral (Singh *et al*., 2011) diberikan sebanyak 7 kali pada masa organogenesis yaitu antara hari ke 6-14 masa kehamilan (Hery *et al*., 2007). Setelah tikus melahirkan, tikus dibesarkan selama minimal 1 bulan agar serum mencukupi. Setelah itu tikus di *sacrificed*. Diambil serumnya untuk dilakukan pengukuran kadar dopamin serum.

4.7.3 Metode Pengukuran Kadar Dopamin serum

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar dopamin serum pada penelitian ini adalah metode ELISA. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Tambahkan 200 µl *washing buffer* untuk masing-masing *well*. Aspirasi *well* untuk menghilangkan cairan dan mencuci wadah 3 kali dengan menggunakan larutan cuci 300µl/*well*. Setelah mencuci terakhir, balikkan *well* untuk menghapus sisa larutan dan noda pada *paper towel*.
2. Tambahkan 100 µl standar atau sampel untuk masing-masing *well* dalam rangkap dua. Tutup dengan *plate sealer* yang tersedia. Inkubasi pada suhu kamar selama minimal 2 jam.
3. Aspirasi *well* untuk menghilangkan cairan dan *washing well* 4 kali seperti pada langkah 1.
4. Tambahkan 100 µl antidopamin serum yang telah diencerkan (0,4 µg/ml) per *well*. Tutup dengan *plate sealer* yang tersedia. Inkubasi pada suhu kamar selama 2 jam.
5. Aspirasi dan *washing well* 4 kali seperti pada langkah 1.

6. Tambahkan 100 µl dari cairan *Color Development Enzyme* (CDE) (1:20) per *well*. Tutup dengan plate sealer yang tersedia. Inkubasi 30 menit pada suhu kamar (atau 37° C selama 30 menit).
7. Aspirasi dan cuci wadah 4 kali seperti pada langkah 1.
8. Tambahkan 100 µl larutan pengembangan warna masing-masing *well*. Inkubasi pada suhu kamar untuk pengembangan warna yang tepat (20-30 menit). Untuk menghentikan reaksi warna, tambahkan 100 µl dari *stop solution* setiap masing-masing *well.*
9. Menggunakan *microtiter plate reader*, baca wadah pada 450 nm panjang gelombang.

4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok tikus kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan I, II, dan III. Setelah tikus dibuntingkan dan dipapar dengan endosulfan, kemudian dilakukan proses *sacrificed* dan diukur kadar dopamin serum pada tikus.

4.8.2 Analisis Data

Data yang terkumpul akan dikoding dan dimasukkan ke dalam file computer. Kemudian dilakukan analisis secara statistik menggunakan program *SPSS version 22.0 for Windows* dengan tingkat kebermaknaan 0,05 (p = 0,05) dan taraf kepercayaan 95% (α = 0,05). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post Hoc Tukey*.