

BAB 4

METODE PENELITIAN

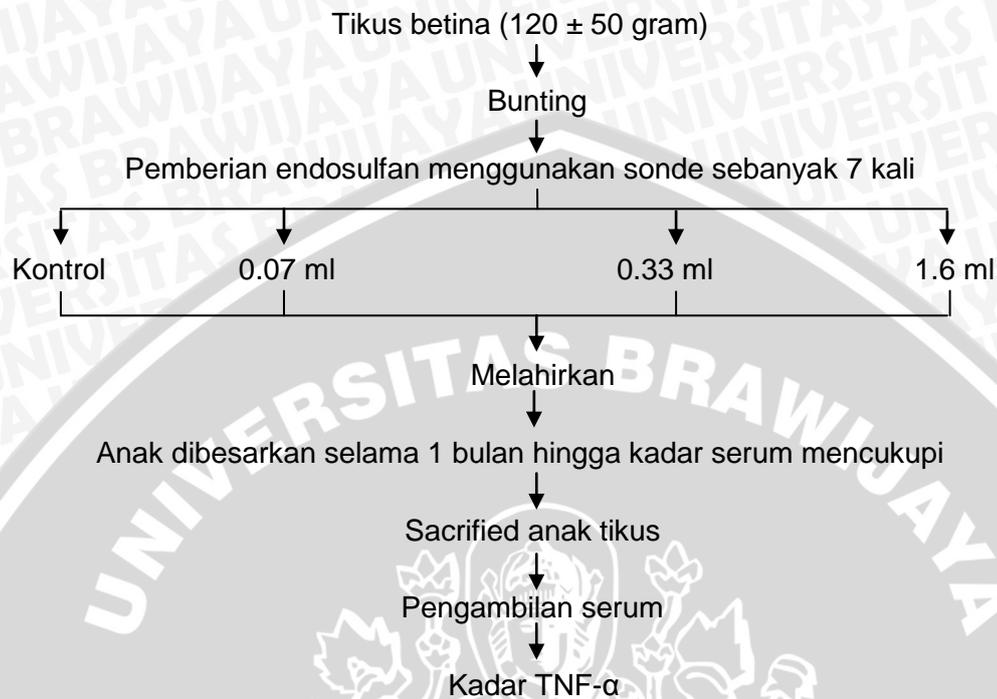
4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

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 (Singh, N. D, *et al.* 2011):

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

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 Fisiologi (Faal) Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Teknik Sampling

Hewan coba 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 : 120-150 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 $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, 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 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilaksanakan pada bulan Juli-Oktober 2013.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Endosulfan berbagai dosis

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Kadar TNF- α pada anak tikus yang induknya dipapar endosulfan saat kehamilan periode organogenesis

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina usia 8 minggu dan memiliki berat badan 120-150 gram.
2. Induksi endosulfan: Endosulfan diberikan dengan cara dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan dengan sonde (Singh, N. D, *et al.* 2011) diberikan sebanyak 7 kali pada masa organogenesis yaitu antara hari ke 6-14 masa kehamilan (Hery W, *et al.* 2007)
3. Pengukuran kadar TNF- α serum: diukur menggunakan ELISA kit.

4.6 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

1. Perawatan tikus

Alat: bak plastik berukuran 45 cm x 35,5cm x 14,5cm, tutup kandang terbuat dari kawat, botol air, sekam, makanan mencit, 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 %, antibiotika, coccidiostat 53 %, tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %)

3. Induksi endosulfan

Bahan: endosulfan dan minyak zaitun

4. Pengambilan serum darah tikus

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

5. Pengecekan kadar TNF- α

Alat: TNF- α 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 dan air. Masing-masing tikus mendapatkan 35 gram dari campuran bahan tersebut dan diberikan secara *ad libitium*. Tikus induk betina digabung dengan tikus jantan dengan perbandingan 2 tikus betina dan 1 tikus jantan dalam satu kandang agar terjadi kehamilan pada tikus betina.

4.7.2 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan tikus betina (120 ± 50 g) Wistar, diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. 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: kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan)
- Kelompok II (Perlakuan 1): hewan coba diberi paparan endosulfan 0.07ml
- Kelompok III (Perlakuan 2): hewan coba diberi paparan endosulfan 0.33ml
- Kelompok IV (Perlakuan 3): hewan coba diberi paparan endosulfan 1.6ml

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

4.7.3 Metode Pengukuran Kadar TNF- α

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar TNF- α serum pada penelitian ini adalah metode ELISA. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut (Komabiotech):

1. Menentukan jumlah well yang digunakan pada microtiter.
2. Ditambahkan 200 ul *washing solution* ke setiap well, dan well diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan cuci well sebanyak 3 kali dengan 300 ul *washing solution* per well. Setelah pencucian terakhir diletakan di atas tisu dengan posisi terbalik
3. Ditambahkan 100 ul sampel di setiap well dan ditutup dengan *sealer* dan di inkubasi dalam suhu ruangan selama 2 jam.
4. Well diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan di cuci sebanyak 4 kali dengan *washing solution*.
5. Setiap well ditambahkan 100 ul antibodi pendeteksi terdilusi (0.5 ug/ml) dan ditutup dengan *sealer* kemudian di inkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam.
6. Well di aspirasi dan dicuci dengan *washing solution* sebanyak 4 kali.

7. Di tambahkan 100 ul *diluted Color Development Enzyme* (1:20 dilute) ke dalam setiap well dan di tutup menggunakan *sealer* kemudian di inkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit.
8. Well diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan di cuci dengan menggunakan *washing solution* sebanyak 4 kali.
9. Tambahkan 100 ul *color development solution* ke dalam setiap well dan inkubasi pada suhu ruangan hingga terbentuk warna yang baik. Sekitar 1-11 menit stop reaksi pewarnaan dengan menambahkan 100ul stop solution ke dalam setiap well.
10. Hasil akan dibaca dengan menggunakan *microtiter plate reader* pada gelombang 450 nm.

4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Pengumpulan Data

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

4.8.2 Analisis Data

Data yang terkumpul akan diedit, dikoding, dimasukkan kedalam file computer. Kemudian dilakukan analisis secara statistik menggunakan program *SPSS 16,0 for Windows XP* dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc test* (Dahlan, 2004).