

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 menggunakan kontrol positif dan negatif.

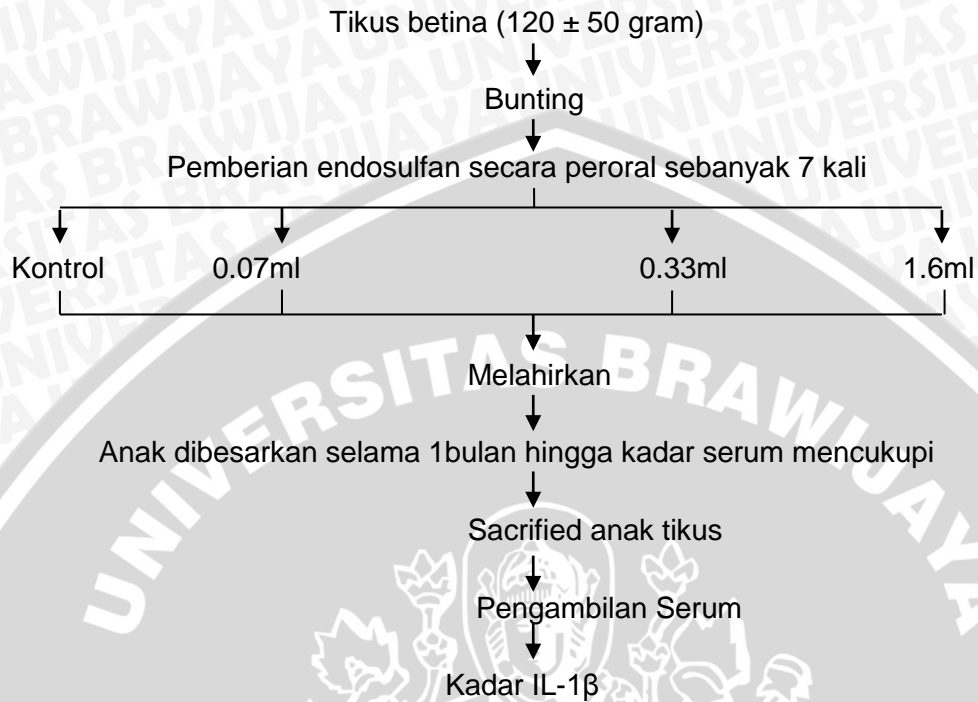
Perbandingan dosis antara kelompok perlakuan I : II : III = 1 : 10 : 50, dengan endosulfan yang tersedia adalah 2 ml maka didapatkan dosis endosulfan yang diberikan adalah:

- 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 → $1/61 \times 2 \text{ ml} : 1.6 \text{ ml}$

Pemberian dosis endosulfan ini dibagi dalam 4 kelompok:

1. Kelompok I: kelompok kontrol (hewan coba yang tidak diberi paparan endosulfan)
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 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 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 $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, 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

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 diberi paparan endosulfan 0.07 ml
3. Kelompok III: hewan coba diberi paparan endosulfan 0.33 ml
4. Kelompok IV: hewan coba diberi paparan endosulfan 1.6 ml.

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Kadar IL-1 β pada anak 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 bunting usia 8 minggu dan memiliki berat badan 120-150 gram.
2. Induksi endosulfan: Endosulfan diberikan dengan cara dilarutkan dalam minyak zaitun dan diberikan intubasi 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)
3. Peningkatan kadar IL-1. Peningkatan kadar IL-1 ini 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, spuit 5 mL, mikroskop binokuler, vortex, centrifuge, cover glass, deck glass, centrifuge tube 15mL, centrifuge tube 50mL, microcentrifuge tube 1,5 mL.

5. Pengecekan kadar IL-1

Alat: IL-1 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 libitium*. 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 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 intubasi 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 IL-1 β .

4.7.3 Metode Pengukuran Kadar IL-1

Pada uji IL-1 langkah awal yang dilakukan adalah menentukan jumlah well yang digunakan pada microtiter. 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* dan diletakan di atas tisu dengan posisi

terbalik. Ditambahkan 100 ul sampel di setiap well dan ditutup dengan *sealer* dan di inkubasi dalam suhu ruangan selama 2 jam. Well diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan di cuci sebanyak 4 kali dengan *washing solution*. Setiap well ditambahkan 100 ul antibodi pendeteksi terdilusi (0.35 ul/ml) dan ditutup dengan *sealer* kemudian di inkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam. Well di aspirasi dan dicuci dengan *washing solution* sebanyak 4 kali. 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. Well diaspirasi untuk menghilangkan cairan dan di cuci dengan menggunakan *washing solution* sebanyak 4 kali. Tambahkan 100 ul *color development solution* ke dalam setiap well dan inkubasi pada suhu ruangan hingga terbentuk warna yang baik. Sekitar 22-32 menit stop reaksi pewarnaan dengan menambahkan 100ul stop solution ke dalam setiap well. Hasil akan dibaca dengan menggunakan microtiter plate reader pada gelombang 450 nm.

4.8 Pengolahan Data

4.9.1 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 IL-1 pada tikus.

4.9.2 Analisis Data

Data yang terkumpul akan diedit, dikoding, dimasukkan kedalam file computer.

Kemudian dilakukan analisis secara statistic menggunakan metode One Way

Anova dengan bantuan software SPSS 16.0 for window. One Way Anova dipilih

sebagai metode analisa data karena dapat memperlihatkan ada tidaknya

perbedaan kelompok-kelompok perlakuan. Uji One Way ANOVA ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kelompok-kelompok perlakuan dan membandingkan rata-rata masing-masing kelompok tersebut. Penelitian dianggap bermakna atau signifikan bila $p \leq 0,05$. Jika memang terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan bermakna, dilanjutkan dengan uji Turkey HSD (post-hoc test). Hasil uji ini menunjukkan kelompok mana saja yang berbeda

