

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus *Rattus norvegicus* strain wistar model normal dengan “*post test only control group design*”, yaitu membandingkan hasil yang didapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**4.2.1 Waktu penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan Agustus 2015.

4.2.2 Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian**4.3.1 Pemilihan Sampel****4.3.1.1 Kriteria Inklusi**

1. Tikus jantan
2. Berat badan tikus 250 gram
3. Usia dewasa (3 bulan)
4. Kondisi sehat (aktif, tidak cacat)

4.3.1.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati dalam masa penelitian.
2. Tikus mengalami sakit.

Penelitian ini membagi sampel dalam lima kelompok perlakuan, yaitu:

- a. Kelompok tikus kontrol (N) : sampel yang tidak diberi perlakuan apapun.
- b. Kelompok perlakuan I : sampel tikus normal dengan paparan debu vulkanik dosis $6,25 \text{ mg/m}^3$ 1 jam/hari selama 28 hari (P1).
- c. Kelompok perlakuan II : sampel tikus normal dengan paparan debu vulkanik dosis $12,5 \text{ mg/m}^3$ 1 jam/hari selama 28 hari (P2).
- d. Kelompok perlakuan III : sampel tikus normal dengan paparan debu vulkanik dosis 25 mg/m^3 1 jam/hari selama 28 hari (P3).

4.3.2 Estimasi Besar Sampel

Berdasarkan rumus Federer (1977) yaitu $p(n-1) \geq 15$, di mana p adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah sampel tiap perlakuan.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 4, yaitu 1 kelompok kontrol 3 kelompok perlakuan sehingga didapat nilai n sebagai berikut: $4(n-1) \geq 15$; $n \geq 4$.

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan minimal 4 ekor tikus sehingga jumlah total tikus yang dibutuhkan sejumlah 16 tikus.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan debu yaitu $6,25 \text{ mg/m}^3$, $12,5 \text{ mg/m}^3$, dan 25 mg/m^3 .

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar MDA (Malondialdehid) hepar tikus.

4.4.3 Definisi Operasional

- a. **Debu vulkanik** : debu vulkanik berasal dari letusan gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur.
- b. **Pemaparan** : pemaparan dilakukan dengan alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
- c. **MDA jaringan hepar** : hasil peroksida asam lemak yang dapat digunakan sebagai parameter pengukuran radikal bebas didalam tubuh. MDA berfungsi sebagai indikator stress oksidatif. Metode yang dipakai dalam pengukuran MDA ini adalah *Thiobarbituric Acid (TBA) Test* yang dibaca dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- a. **Bahan Makanan Tikus**
Confeed PAR-S, tepung terigu tinggi protein, air.
- b. **Bahan paparan debu vulkanik**
Debu vulkanik dari Gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur.

4.5.2 Instrumen Penelitian

- a. **Alat Pemeliharaan Hewan Coba**

Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan tutup kandang terbuat dari kawat dan botol air. Alas kandang adalah sekam padi yang diganti setiap tiga hari. Penimbangan berat badan dengan neraca Sartorius.

b. Alat Pembuatan Makanan Hewan Coba

Timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, dan nampan.

c. Alat Pemapar Debu Vulkanik

Alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

d. Alat Pengambilan Organ

Seperangkat alat bedah, spuit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas.

e. Alat untuk Mengukur Kadar MDA Hepar

Teflon, neraca statistic, kertas tissue, gunting, vortex pipe, sentrifuge, tabung reaksi, pipet, dan UV-visible spektrofotometer.

4.6 Prosedur Penelitian**4.6.1 Adaptasi**

Adaptasi hewan coba selama 2 minggu di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.6.2 Pembuatan Diet

Pembuatan diet normal dilakukan setiap hari. Kebutuhan makanan tikus dewasa per ekor setiap hari adalah 40 gram yang terdiri dari campuran confeed PAR-S, tepung terigu tinggi protein, dan air. Pembuatan ransum dilakukan setiap hari dengan ketentuan 40 gr/ekor dan dibentuk bulatan agar memperkuat tekstur pakan untuk ditimbang sisanya keesokan harinya.

4.6.3 Pemaparan Debu Vulkanik

Pemaparan debu vulkanik dilakukan dengan alat *dust exposure* dengan volume 0,5 m³ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Debu vulkanik berasal dari letusan Gunung Kelud di daerah Kediri, Jawa Timur. Prinsip dari alat tersebut adalah menyediakan

lingkungan ambien yang mengandung debu vulkanik yang dapat terinhalasi ke saluran nafas hewan coba. Aliran udara pada blower di alat tersebut adalah 1,5-2 liter/menit. Dosis paparan debu vulkanik dibuat secara bertingkat dengan lama paparan 1 jam per hari selama 28 hari (subkronik). Pemaparan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.5 Pembiusan Hewan Coba

Pembiusan dilakukan pada kelompok K dan kelompok P1, P2, dan P3 . Pembiusan dilakukan dengan anestesi injeksi ketamin 30 mg/kgBB intraperitoneal.

4.6.6 Pengambilan Sampel Organ Hepar Hewan Coba

Pada hari akhir perlakuan, tikus dipuaskan selama 10 jam kemudian kadar MDA jaringan hepar tikus diperiksa.

4.6.7 Prinsip pengukuran Kadar MDA Hepar

Pengukuran kadar MDA memiliki prinsip berupa reaksi satu molekul MDA dengan dua molekul asam tiobarbiturat (TBA) membentuk kompleks senyawa MDA-TBA yang berwarna pink dan kuantitasnya dapat di baca oleh alat spektrofotometer (Totur, *et al*, 2006).

4.6.8 Pengambilan Jaringan Hepar

Yang pertama harus dilakukan adalah menimbang sampel hepar hewan coba sebanyak 100 mg, kemudian haluskan jaringan hepar tersebut dengan buff fosfat pH 7,4 sehingga menjadi 0.2 homogenat jaringan hepar. Tambahkan woul triton x 0,1% vortex, TCA 100% 100 ml + HCL 1 N 250 ml vortex dan 4 test (+) Na Thio 100 ml. Selanjutnya panaskan campuran tersebut pada suhu 100°C selama 25 menit (Aulanni'am, *et al*, 2012).

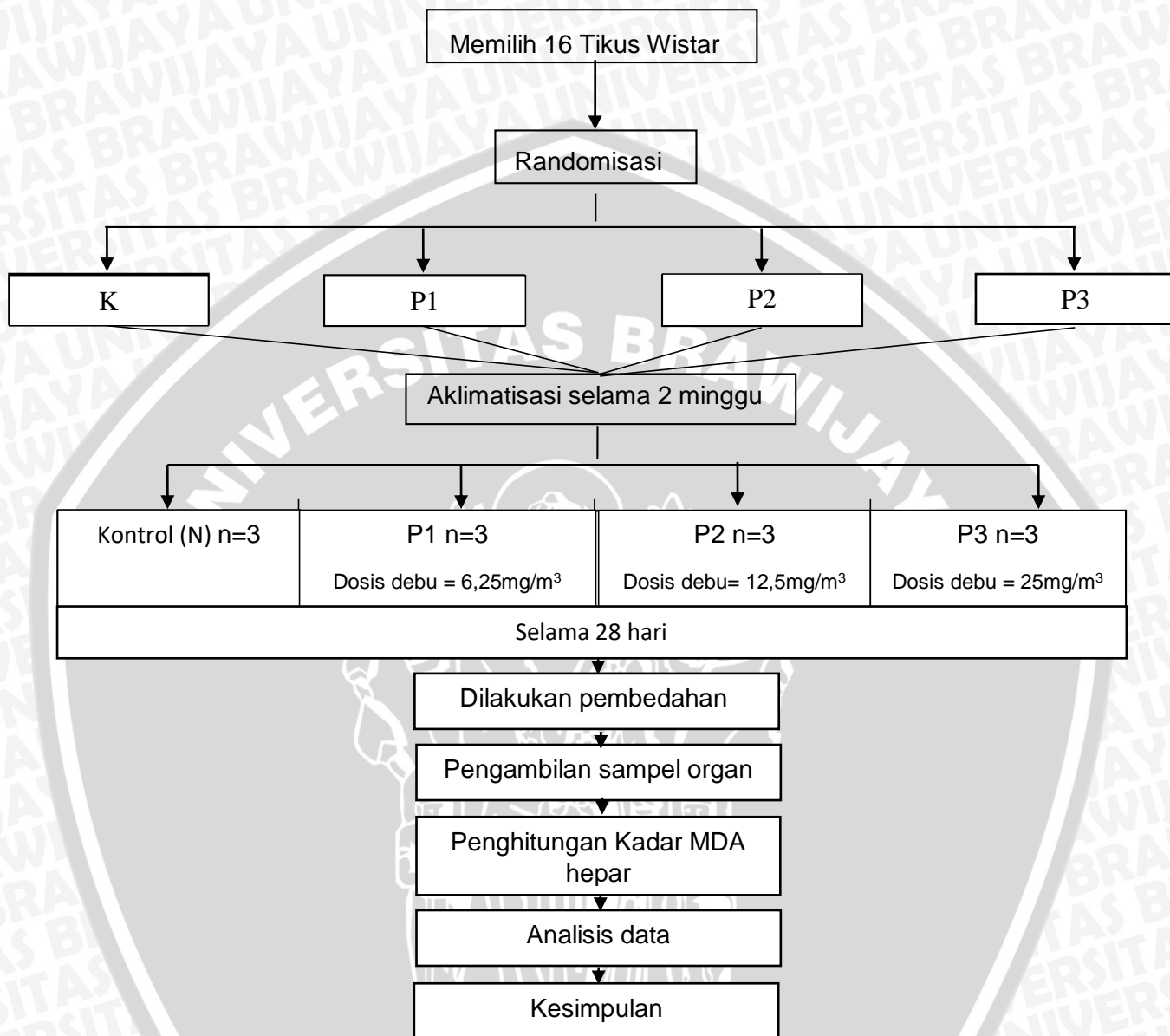
4.6.9 Pengukuran Kadar MDA Hepar

Campuran tersebut selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3000rpm selama 10 menit. Lapisan supernatan diambil dan hasilnya dijadikan 3 cc. Absorbannya dibaca dengan spektrofotometer gelombang 532 nm. Nilai TBARS dinyatakan dalam nmol/MDA/g jaringan hepar (Totur, *et al*, 2006).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.7 Skema Alur Penelitian

Keterangan:

- K : Kontrol (N)
- P1 : Perlakuan 1
- P2 : Perlakuan 2
- P3 : Perlakuan 3

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Semua kelompok tikus setiap 4 hari ditimbang berat badannya agar peneliti mengetahui perkembangan berat badan tikus serta ditimbang sisa makanan tiap harinya. Pemaparan debu vulkanik dilakukan 1 jam per hari selama 28 hari. Kemudian tikus dimatikan sesuai dengan *ethical clearance*, dibedah, dan diambil organ hepar untuk diambil jaringannya.

4.8.2 Analisa Data

Data mengenai pengaruh debu vulkanik terhadap MDA jaringan hepar tikus *wistar (Rattus norvegicus)* dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 17.0 dengan metode Uji statistika *Analysis of Variance (ANOVA) Oneway*. Hipotesis ditentukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh $>0,05$, sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh $<0,05$. H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh paparan debu vulkanik terhadap nilai kadar kolesterol total antar kelompok. Sedangkan H_1 adalah terdapat pengaruh debu vulkanik terhadap nilai kadar kolesterol total antar kelompok. Sebelum melakukan analisa data dengan uji anova, maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji *One-way ANOVA* untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji *One-way ANOVA* adalah populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varian dari populasi-populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain.

Hasil pengukuran kadar MDA jaringan hepar tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf

kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a. **Uji normalitas data:** bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi 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:** bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi yang normal.
- c. **Uji *One-way* ANOVA:** bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan nilai kadar MDA antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan jumlah kadar MDA yang signifikan antar kelompok. Perbedaan rata-rata kadar MDA dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$, atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji ANOVA ini hipotesis Null yang diajukan

adalah “Keempat kelompok mempunyai nilai kadar kolesterol total yang tidak sama”.

d. **Post Hoc Tukey Test (uji Least Significant Difference):** bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

e. **Uji korelasi Pearson:** untuk mengetahui apakah dosis paparan debu vulkanik berpengaruh terhadap kadar MDA total.

