

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Subjek Penelitian

##### 3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan.

##### 3.1.2 Kriteria Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan harus memenuhi kriteria sebagai berikut

###### a. Kriteria Inklusi

- 1) Mencit jantan
- 2) Usia 8-10 minggu
- 3) Berat badan 35-40 gram
- 4) Mencit dalam keadaan sehat (responsif, bergerak aktif, tidak ada luka, dan feses tidak cair)

###### b. Kriteria Eksklusi

Berat badan turun 10% selama masa adaptasi.

##### 3.1.3 Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian ini menggunakan metode *random sampling*, dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Jumlah sampel minimal yang digunakan dihitung menggunakan *mead equation*:

$$e = n - t^{17}$$

Keterangan:

$e$  = *error degree of freedom* (harus 10 sampai 20)

$n$  = jumlah sampel keseluruhan

$t$  = jumlah kelompok perlakuan

$$e = n - t$$

$$15 = n - 2$$

$$n = 17$$

Berdasarkan perhitungan di atas jumlah sampel penelitian ditetapkan sebanyak 18 ekor mencit. Karena terdapat dua kelompok perlakuan, maka setiap kelompok terdiri dari 9 ekor mencit. Peneliti menambah satu ekor mencit di setiap kelompok sebagai antisipasi terjadinya *drop out*, sehingga total keseluruhan 20 ekor mencit.

### 3.1.4 Alat dan Bahan

#### a. Alat Penelitian

- 1) Kandang mencit ukuran 28 x 34 x 18 cm
- 2) Serbuk kayu
- 3) Tempat minum mencit
- 4) Tempat makan mencit
- 5) Label nama
- 6) Spidol
- 7) Timbangan
- 8) Preparat
- 9) Mikroskop yang dilengkapi *optilab*

10) *Image raster*

#### b. Bahan Penelitian

- 1) Rokok kretek
- 2) Bahan pakan

## 3.2 Metode Penelitian

### 3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni *in vivo* dengan rancangan acak lengkap. Subjek penelitian yang digunakan adalah 20 mencit jantan dengan usia 8-10 minggu, berat badan 35-40 gram. Subjek penelitian dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat paparan asap rokok tersier selama 30 hari.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Paparan asap rokok tersier.
- b. Variable terikat : Diameter arteri koronaria mencit jantan.
- c. Variabel terkontrol: Hewan coba dan kondisi lingkungan percobaan.

Adapun definisi operasional yang terkait dengan penelitian ini disajikan dalam tabel 3.1.

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

No	Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Satuan	Skala
1	Paparan asap rokok tersier	Paparan asap rokok yang mengendap di lingkungan setelah rokok dipadamkan dan didiamkan selama satu jam.	Pengasapan kandang mencit	0: tidak terpapar asap rokok tersier 1: terpapar asap rokok tersier	Kategorik
2	Diameter arteri koronaria	Panjang diameter yang diambil dari garis tengah melintang arteri koronaria anterior desending kiri dan arteri koronaria sirkumfleks posterior.	Image ruster	mikrometer	Numerik

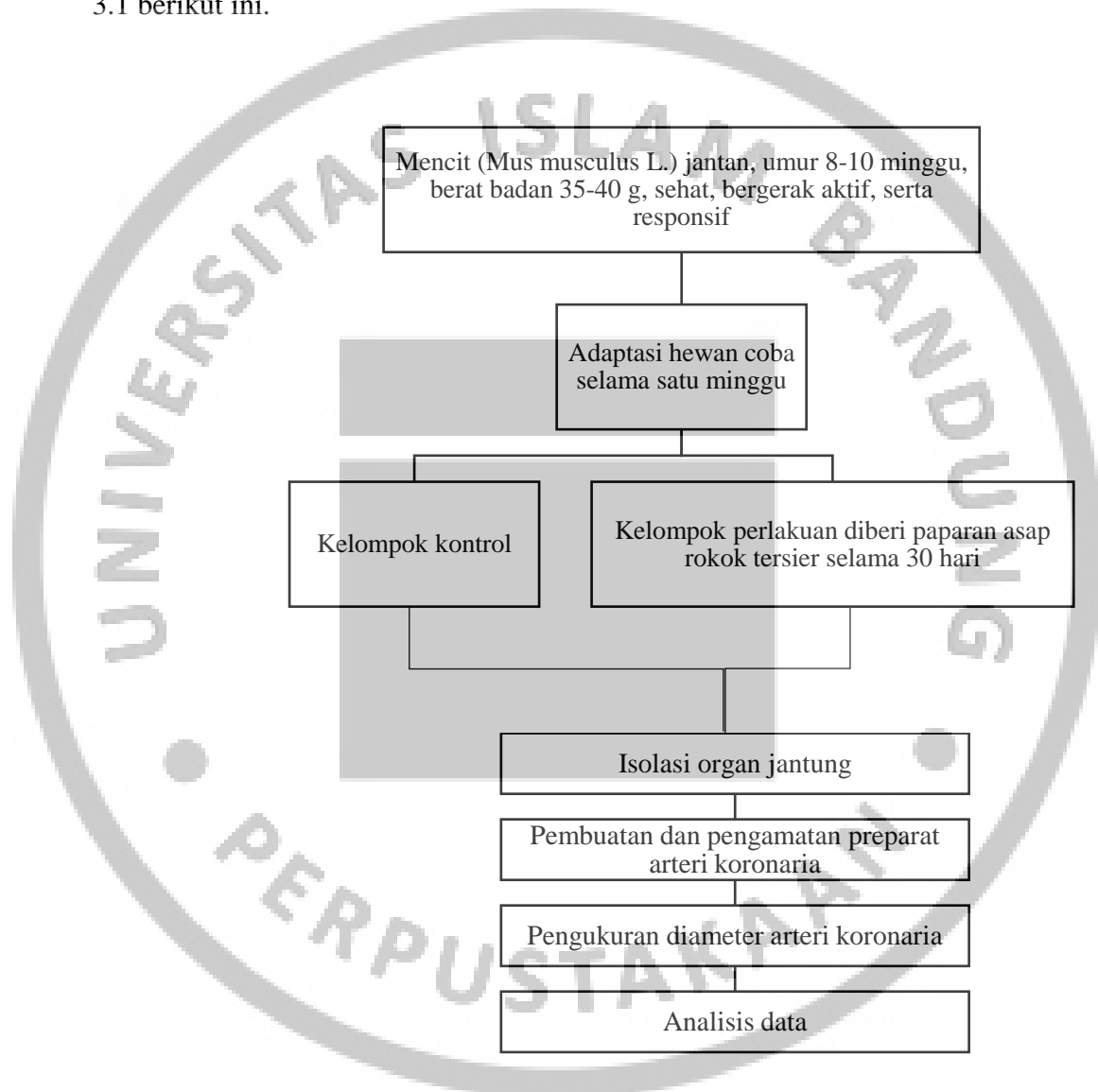
### 3.2.3 Prosedur Penelitian

Pada awalnya hewan coba diadaptasikan selama 1 minggu. Selama penelitian hewan coba ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 28 x 34 x 14 cm. Setiap kandang berisi 10 ekor hewan coba. Kandang dilengkapi tempat makan dan minum sebagai akses makanan dan minuman bagi hewan coba. Alas kandang diberi serbuk kayu dan diganti paling sedikit 3 hari sekali. Mencit ditempatkan di kandang dengan suhu, dan ventilasi yang baik, serta pencahayaan yang cukup, 12 jam terang dan 12 jam gelap.

Setelah masa adaptasi dilakukan pemberian paparan asap rokok tersier dengan cara mengasapi kandang hewan coba. Saat proses tersebut hewan coba dipindahkan ke kandang lain. Agar hewan coba tidak terpapar asap rokok secara langsung, pemaparan kandang dilakukan di tempat yang terpisah dari hewan coba. Satu batang rokok dibakar sampai habis dan didiamkan selama satu jam setelah rokok padam. Setelah pengasapan kandang mencit selesai, mencit dimasukkan kedalam kandang yang sudah diasapi. pemaparan dilakukan setiap hari selama 30 hari.

Setelah pemaparan selesai mencit jantan dikorbankan dengan cara diskolasi servikal untuk kemudian dibedah dan diambil organ jantung. Dibuat preparat dari organ jantung diantara apex dan batas inferior jantung untuk mendapatkan gambaran melintang arteri koronaria bagian LAD segmen keempat untuk melihat arteri koronaria anterior. Pembedahan arteri koronaria sirkumfleks posterior dilakukan pada potongan melintang setinggi atrium.<sup>8,11</sup> Pewarnaan dilakukan dengan metode pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE), lalu preparat tersebut diamati

dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dilengkapi *optilab*. Pengukuran diameter arteri koronaria dilakukan dengan mengukur garis tengah paling kecil dari lumen pembuluh darah menggunakan aplikasi *image raster* yang sudah dikalibrasi. Adapun ringkasan tahapan penelitian disajikan pada gambar 3.1 berikut ini.



**Gambar 3.1 Alur Penelitian**

### 3.2.4 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk uji normalitas adalah *Saphiro-Wilk*. Data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan *T-Test Independent*. Data terdistribusi tidak normal, analisis data yang digunakan *Mann Whitney*.

### 3.2.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Agustus 2019 bertempat di Laboratorium Biologi Medik Universitas Islam Bandung Jalan Tamansari No. 22.

### 3.2.6 Aspek Etika Penelitian

Pemanfaatan hewan coba harus didasarkan oleh prinsip 3R, yaitu:

a. *Replacement*

Eksperimen menggantikan hewan percobaan dengan hewan lain yang sudah diperhitungkan dengan baik dari pengalaman maupun literatur sebelumnya. Dalam penelitian ini, mengganti dengan mencit yang dapat menggambarkan fisiologis tubuh manusia.

b. *Reduction*

Pemanfaatan hewan coba penelitian diusahakan dalam jumlah yang sedikit, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Pada penelitian ini, jumlah sampel dihitung dengan *resource equation* (Mead 1988).

c. *Refinement*

Eksperimen harus meminimalisir penderitaan hewan coba selama penelitian dengan cara ditempatkan dalam kandang berukuran 28 x 34 x 14 cm, dengan setiap kandang berisi 10 ekor hewan coba. Kandang beralas serbuk kayu yang diganti minimal 3 hari sekali. Disediakan kandang yang memadai serta suhu, ventilasi,

pencahayaan, dan kelembaban yang cukup. Disediakan akses makan dan minum di setiap kandang. Selama perlakuan harus hati-hati dan dilakukan oleh yang ahli.

