

BAB III

SUBJEK/OBJEK/BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek/Objek/Bahan Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini menggunakan hewan percobaan berupa mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa dengan usia 8-10 minggu, berat badan antara 25-35 gram. Subjek penelitian ini sebanyak 20 ekor mencit jantan yang terbagi menjadi dua kelompok secara acak, yaitu kelompok kontrol yang tidak mendapat paparan asap rokok tersier dan kelompok perlakuan yang mendapat paparan asap rokok tersier selama 29 hari. Subjek penelitian yang digunakan harus memiliki kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

1. Mencit jantan
2. Berusia 8-10 minggu
3. Berat badan 25-35 gram
4. Mencit belum pernah kawin
5. Mencit dalam kondisi sehat (sadar, bergerak aktif, refleks baik, lincah, mata terbuka; telinga berdiri tegak, berbulu bersih, dan tidak ada luka)

b. Kriteria eksklusi

Terjadi kematian dan penurunan berat badan mencit jantan selama masa penelitian.

3.1.2 Penetapan Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan “*mead equation*” atau “*resource equation*” adapun rumus untuk persamaan sebagai berikut.

$$E = N - T$$

Keterangan : E = derajat kebebasan yang berada pada rentang 10-20

N = jumlah total hewan coba ($N = n \times T$)

T = jumlah perlakuan

n = jumlah hewan coba per kelompok perlakuan

Berdasarkan rumusan tersebut dapat diperoleh besar sampel minimum dan maksimum sebagai berikut.

$$N_{\text{minimum}} = E_{\text{minimum}} + T$$

$$= 10 + 2$$

$$= 12$$

$$\text{maka } n = N/T = 12/2 = 6$$

$$N_{\text{maksimum}} = E_{\text{maksimum}} + T$$

$$= 20 + 2$$

$$= 22$$

$$\text{maka } n = N/T = 22/2 = 11$$

Perhitungan menggunakan persamaan mead menunjukkan bahwa rentang jumlah sampel yang dapat di gunakan pada penelitian ini adalah 6–11 ekor hewan coba /kelompok. Namun, pada penelitian ini digunakan derajat kebebasan 15 (E = 15). Sehingga jumlah sampel yang diperoleh adalah

$$E = N - T$$

$$N = E + T$$

$$= 15 + 2$$

$$= 17$$

Maka $N/T = 17/2 = 8.5 \sim 9$

Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh jumlah sampel per kelompok percobaan adalah 8,5~9 ekor. Kemudian terdapat adanya penambahan sebesar 10% per kelompok, dikhawatirkan adanya *drop out* di tengah penelitian, adapun jumlah kelompoknya terdiri dari dua kelompok perlakuan, maka setiap kelompok hewan percobaan terdiri dari 10 ekor mencit atau total 20 ekor untuk seluruh kelompok.

3.1.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

1. Kandang mencit untuk masing-masing kelompok (1 kandang berisi 5 ekor) dengan ukuran 28 x 34 x 18 cm bahan dari *plexi glass*.
2. Masker
3. Tempat makan mencit

4. Tempat minum mencit
5. Sarung tangan (*handgloves*)
6. Label nama
7. Spidol
8. *Fotometer sumifin C1904*
9. *Micro pipette*
10. Tabung reaksi kecil
11. Peralatan untuk pemeriksaan

3.1.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa satu batang rokok yang dipaparkan dalam satu kandang setiap hari selama 29 hari. Jenis rokok yang akan dipaparkan pada penelitian ini adalah rokok kretek. Dengan demikian jumlah rokok yang dibutuhkan sebanyak 29 batang rokok kretek.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

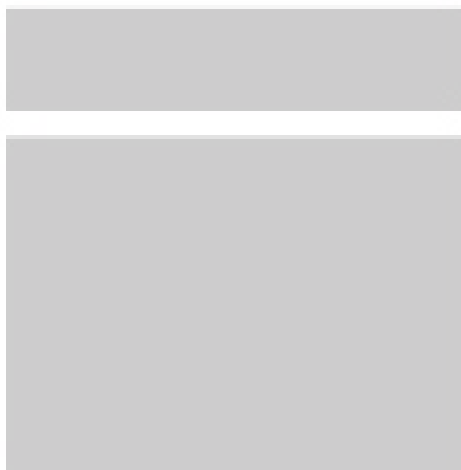
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium murni *in vivo* dengan *randomised allocation* menggunakan koin untuk memilih hewan coba secara acak dengan pola *post test*, yaitu melakukan observasi setelah perlakuan diberikan.

Fokus penelitian ini adalah mempelajari pengaruh paparan asap rokok tersier pada mencit jantan yang dibagi secara acak menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi paparan asap rokok tersier selama 29 hari terhadap kadar kolesterol total dan trigliserida mencit.

3.2.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas: paparan asap rokok tersier.
- b. Variabel Terikat: kadar kolesterol total dan kadar trigliserida
- c. Variabel Terkendali: Jenis kelamin mencit, umur mencit, berat badan mencit, makanan mencit, minuman mencit, kandang mencit, temperatur kandang, pencahayaan kandang, ventilasi pada bagian atap kandang, ukuran kandang 28 x 34 x 18 cm dan rokok kretek.

Adapun Definisi Operasional yang terkait dengan penelitian ini disajikan dalam bentuk table 3.1



Tabel 3.1 Definisi Operasional

| No | Variabel | Definisi Operasional | Alat ukur | Satuan | Skala |
|----|----------------------------|--|-------------------------|--|---------|
| 1 | Paparan asap rokok tersier | Asap rokok yang tersisa setelah perokok primer merokok, sehingga yang tersisa hanya residu rokok yang menempel pada permukaan dalam ruangan. | Asap | 0 : Tidak terpapar asap rokok 1 : Terpapar asap rokok tersier | Nominal |
| 2 | Kadar kolesterol darah | Jumlah kadar kolesterol total yang di ambil dari ekor mencit | Fotometer Sumifin C1904 | Mg/dl | Rasio |
| 3 | Kadar trigliserida | Jumlah kadar trigliserida yang di ambil dari ekor mencit | Fotometer Sumifin C1904 | Mg/dl | Rasio |

3.2.3 Prosedur Penelitian

3.2.3.1 Adaptasi Hewan Coba

Pada awalnya hewan percobaan yaitu mencit jantan akan diadaptasikan selama tujuh hari. Selama penelitian hewan coba ditempatkan pada kandang yang berbahan *plexi glass* dengan ukuran 28 x 34 x 14 cm. Kandang dilengkapi tempat makan dan minum. Alas kandang diberi serbuk kayu, untuk menyerap urin dan kotoran hewan percobaan. Alas kandang diberi serbuk kayu dan diganti paling sedikit tiga hari sekali.

3.2.3.2 Pembagian Kelompok Percobaan

Subjek penelitian ini sebanyak 20 ekor mencit jantan yang terbagi menjadi dua kelompok secara acak, yaitu kelompok kontrol yang tidak mendapat paparan asap rokok tersier serta kelompok perlakuan yang mendapat paparan asap rokok tersier selama 29 hari.

3.2.3.3 Pemberian atau Perlakuan Paparan Asap Rokok Tersier

Pemberian paparan asap rokok tersier yaitu dengan cara mengasapi kandang hewan coba. Pada saat pengasapan dilakukan, hewan coba dipindahkan ke kandang lain, agar hewan coba tidak terpapar asap rokok secara langsung. Setelah pemberian pengasapan tunggu sekitar satu jam hingga asap tidak terlihat, kemudian kembalikan hewan coba ke kandang yang telah dipaparkan asap rokok. Pengasapan ini dilakukan setiap hari selama 29 hari. Dengan sebatang rokok dalam satu kandang setiap harinya. Setelah selesai periode paparan asap rokok tersier selama 29 hari, dilakukan pembedahan terhadap hewan coba. Darah diambil dari jantung dengan menggunakan jarum suntik.

3.2.3.4 Pemeriksaan Kadar Kolesterol total dan Trigliserida

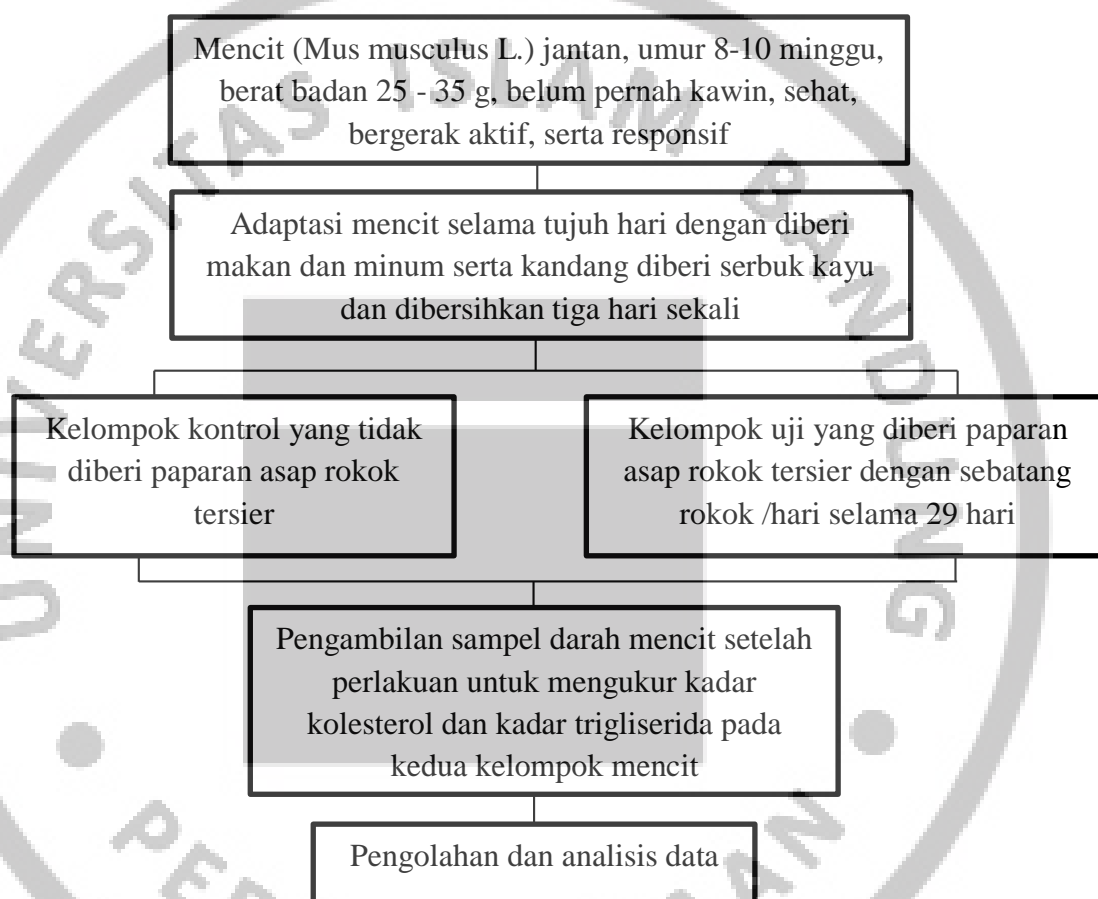
Dilakukan pengukuran kadar kolesterol total dan trigliserida menggunakan alat *Fotometer Sumifin C1904* sesuai prosedur dari laboratorium Prodia atau Pramita.

Tahapan pengukuran kadar kolesterol total dan trigliserida sebagai berikut:

1. Sediakan tabung reaksi untuk blanko, standar dan sampel.
2. Masukkan 1000ul reagen kolesterol kedalam masing-masing tabung reaksi untuk blanko, standar dan sampel.
3. Untuk tabung blanko yang telah diisi reagen kolesterol dan trigliserida 1000ul tambahkan *aquades* 10ul.
4. Untuk tabung standar yang telah diisi reagen kolesterol dan trigliserida 1000ul tambahkan reagen standar kolesterol 10ul.
5. Untuk tabung serum yang telah diisi reagen kolesterol dan trigliserida 1000ul tambahkan sampel serum 10ul.

6. Lalu inkubasi pada suhu 37 selama 10 menit atau pada suhu 25-30 selama 20 menit.
7. Baca absorban blanko, standar dan sampel di fotometer pada panjang gelombang 546.

3.2.4 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.2.5 Analisis Data

Sebelum dilakukan analisis statistik, dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro wilks* untuk melihat seluruh data. Hasil uji *shapiro wilks* menunjukkan bahwa data terdistribus normal. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Dan hasil uji homogenitas menunjukkan homogen pada kadar

kolesterol total dan kadar trigliserida. Dengan data yang terdistribusi normal dan homogen, maka data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *T-Test Independent* dengan selang waktu kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

3.2.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juni 2019 bertempat di Laboratorium Biologi Medik Universitas Islam Bandung Jalan Tamansari No.22 dan Laboratorium Prodia atau Pramita.

3.2.7 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang secara langsung memberikan perlakuan pada hewan coba (*in vivo*) dan dapat menyebabkan rasa ketidaknyamanan pada hewan coba. Berdasarkan hal tersebut terdapat beberapa aspek penelitian yang harus dipatuhi oleh peneliti selama penelitian dengan menerapkan prinsip 3R yaitu *replacement, reduction, dan refinement*.

1. *Replacement*, mengganti hewan percobaan dengan alternatif lain yang sudah diperhitungkan dengan baik dari pengalaman maupun literatur sebelumnya. Dan mencit dipilih menjadi hewan coba karena memiliki karakteristik yang sama dengan manusia dan merupakan organisme dengan ordo yang rendah dibandingkan tikus dan hewan lainnya.
2. *Reduction*, meminimalisir penderitaan hewan coba dengan menggunakan hewan seminimal mungkin namun tetap mendapatkan hasil yang optimal. Penerapan prinsip ini menggunakan rumus *mead equation* untuk menghitung jumlah hewan pada penelitian ini.

3. *Refinement*, perlakuan pada hewan coba harus sesuai dengan azas kesejahteraan hewan, berupa 5 prinsip *freedom* yakni, *Freedom from hunger and thirst* artinya mencit akan rutin diberikan makan setiap hari berupa pakan dan minuman standar pada tempat yang telah disediakan di dalam kandang. *Freedom from pain, injury, and disease* artinya rasa nyeri, luka dan penyakit akan diminimalisir selama perlakuan terhadap subjek dengan cara perlakuan oleh orang yang berkompeten dan profesional. *Freedom from fear and distress* artinya rasa takut dan stress yang dialami mencit akan dikurangi dengan cara memberikan ruang yang cukup dengan kandang sedikit besar. Selain itu dilakukan pula aklimatisasi selama 7 hari untuk membiasakan mencit di lingkungan baru. *Freedom from discomfort* artinya mencit harus bebas dari rasa tidak nyaman dengan cara kandang dibersihkan setiap tiga kali sehari. *Freedom to express natural behavior* artinya mencit harus bebas mengekspresikan tingkah laku dengan cara mencit bebas bergerak di dalam kandang.