

BAB IV

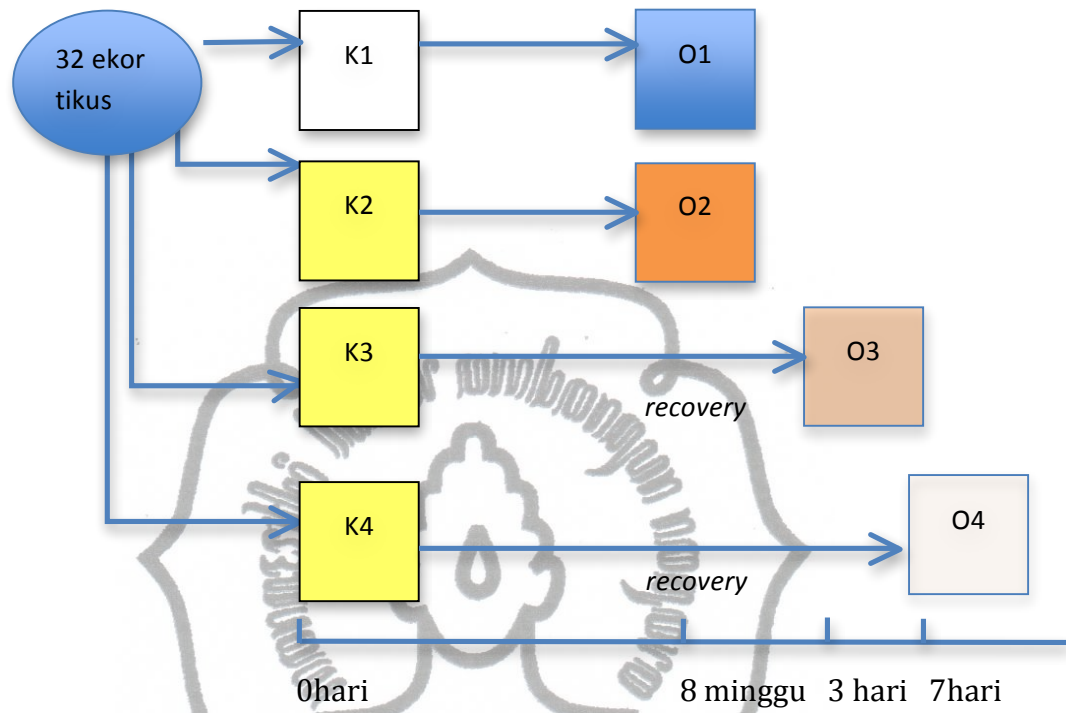
MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan penelitian yang digunakan

Metode penelitian yang digunakan adalah metode *true experimental* dengan menggunakan “*randomized post-test only control group design*”. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan *overtraining*, *overtraining* dengan *recovery* tiga hari dan *recovery* tujuh hari dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan *overtraining* (olahraga proporsional sebagai kelompok kontrol).

Pada sampel penelitian yang telah dilakukan alokasi sampel secara random menjadi empat kelompok yaitu satu kelompok kontrol (olahraga proporsional), satu kelompok perlakuan *overtraining* tanpa *recovery*, satu kelompok perlakuan *overtraining* dengan diberikan *recovery* selama tiga hari dan satu kelompok lainnya diberikan perlakuan *overtraining* dan diberikan durasi *recovery* selama tujuh hari.

Rancangan penelitian ini dijelaskan melalui bagan rancangan penelitian di bawah ini:



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

Keterangan:

- K : Kelompok Perlakuan
- O₁ : Observasi kelompok kontrol olahraga proporsional
- O₂ : Observasi kelompok kontrol *overtraining*
- O₃ : Observasi kelompok perlakuan *overtraining* dan diberikan *recovery* selama tiga hari
- O₄ : Observasi kelompok perlakuan *overtraining* dan diberikan *recovery* selama tujuh hari

4.2 Populasi, besar sampel dan teknik pengambilan sampel.

4.2.1. Populasi

Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah tikus putih jenis *Ratus Norwegicus* galur *Wistar* berjenis kelamin jantan, berusia 3-4 bulan, dengan berat badan 180-220 gram yang ada di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar.

4.2.2. Sampel

Sampel penelitian menggunakan tikus putih jenis *Ratus Norwegicus* galur *Wistar* berjenis kelamin jantan, berusia 3-4 bulan dan dengan berat badan antara 180-220 gram. Dipilih tikus jantan agar tidak terdapat pengaruh hormonal dan kehamilan. Dipilih usia 3-4 bulan karena tikus masih dalam usia dewasa muda dan cukup besar sehingga gambaran histologis jantung mudah diamati di bawah mikroskop. Pada penelitian ini, besar sampel yang digunakan dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu; $(n-1)(t-1) \geq 15$, dimana n adalah besar sampel minimal dari masing-masing kelompok, dan t adalah jumlah kelompok. Pada penelitian ini, keseluruhan jumlah kelompok sebanyak empat kelompok, sehingga jumlah sampel minimal dari masing-masing kelompok adalah :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n=7$$

Secara acak sederhana, dengan penghitungan berbantuan perangkat lunak *sample size G Power*, didapatkan hasil yang sama dengan menggunakan rumus Federer, dimana sampel minimum yang dibutuhkan adalah 28 ekor tikus, dan selanjutnya di bagi dalam empat kelompok masing-masing kelompok terdiri dari tujuh ekor tikus (Charan and Katharina, 2013). Kemudian dengan estimasi cadangan 10 % untuk mengantisipasi adanya tikus yang *drop out* (misalnya ada tikus yang mati selama penelitian), sehingga diperoleh delapan tikus untuk masing –masing kelompok perlakuan. Dengan demikian maka besar sampel dalam penelitian ini adalah 32 ekor tikus.

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan yang memenuhi kriteria eligibilitas penelitian. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan langkah –langkah sebagai berikut :

Secara acak sederhana, dari populasi terjangkau kemudian dilakukan pemilihan sampel dalam penelitian ini dengan menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi adalah sebagai berikut:

4.2.3.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus sehat
2. Tikus Jantan
3. Umur 3-4 bulan
4. Berat badan 180 – 220 gram

4.2.3.2. Kriteria Eksklusi : Tikus yang sedang sakit

4.2.3.3. Kriteria Drop Out : Tikus mati

4.3 Variabel penelitian dan denifisi operasional variabel.

4.3.1. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Durasi *Recovery*
2. Variabel tergantung: Kerusakan Miokardium

4.3.2. Definisi Operasional Variabel

1. Durasi *Recovery* :

Definisi Operasional : adalah rentang waktu yang diperlukan pada fase istirahat pasca latihan yang diberikan untuk tujuan pemulihan setelah pembebanan latihan fisik. *Recovery* diberikan berupa *recovery* pasif. *Recovery* pasif berupa istirahat tanpa latihan pada periode pasca latihan dengan durasi tiga dan tujuh hari.

2. Kerusakan Miokardium :

- a. Definisi operasional :

Merupakan perubahan patologis dari miokardium yang ditandai dengan perubahan patologis pada biomarker molekuler dan gambaran histopatologis miokardium.

- 2.1. Biomarker molekuler kerusakan miokardium yang diukur pada penelitian ini adalah konsentrasi Malondialdehid (MDA) miokardium dan konsentrasi SOD miokardium

- 2.1.1. Konsentrasi Malondialdehyde (MDA) Miokardium

Definisi operasional: merupakan produk akhir peroksida lipid dan dapat digunakan sebagai penanda (biomarker) terjadinya stres oksidatif. Konsentrasi MDA yang diukur adalah spesifik untuk miokardium.

Alat ukur : Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode ELISA.

Skala pengukuran : ng/ml

Skala data : numerik

2.1.2. Konsentrasi SOD Miokardium

Definisi Operasional : adalah suatu enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen mitokondria. Konsentrasi SOD diukur dari jaringan miokardium dan spesifik untuk SOD yang dihasilkan oleh mitokondria.

Alat ukur : Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode ELISA.

Skala Pengukuran : ng/ml

Skala Data : numerik

2.2. Gambaran histopatologi kerusakan miokardium yang diperiksa pada penelitian ini adalah : Hipertrofi ventrikel kiri, Nekrosis miokardium, dan Kondensasi khromatin

2.2.1. Hipertrofi Ventrikel Kiri

Definisi operasional : Parameter yang diamati berupa indeks perubahan ukuran ketebalan miokardium pada ventrikel kiri dibandingkan dengan hipertrofi fisiologis pada miokardium tikus tanpa perlakuan. Hipertrofi ventrikel diamati dari miokardium tikus yang tercat dengan pengecatan Hematoksisilin Eosin (HE).

Alat Ukur : Mikroskop

Skala Pengukuran : μm

Skala Data : numerik

2.2.2. Nekrosis Miokardium

Definisi operasional : adalah jumlah sel otot jantung (kardiomiosit) yang mengalami piknosis, kariolisis dan karioreksis inti sel. Pengukuran nekrosis pada preparat merupakan gambaran nekrosis yang tampak dari lima lapang pandang dalam satu preparat di bawah mikroskop. Nekrosis miokardium diamati dari jaringan miokard tikus yang tercat dengan pengecatan Hematoksisilin Eosin (HE) dan hasil pengamatan merupakan indeks dari nekrosis miosit pada preparat.

Alat Ukur : Mikroskop

Skala Pengukuran : persentase

Skala Data : numerik

2.2.3. Kondensasi Kromatin

Definisi Operasional : adalah jumlah inti sel otot jantung yang mengalami penggumpalan kromatin. Gambaran kondensasi berupa peningkatan ketebalan kromatin yang tampak seperti menggumpal dari lima lapang pandang dalam satu preparat di bawah mikroskop. Kondensasi khromatin oleh pakar disimpulkan sebagai peningkatan aktivitas kromatin kardiomiosit dimana inti tampak mengental. Kondensasi kromatin diamati dari jaringan miokard tikus yang tercat dengan pengecatan Hematoksisilin Eosin (HE).

Alat Ukur : Mikroskop

Skala pengukuran : persentase

Skala Data : numerik

4.4 Bahan penelitian

Bahan – bahan yang diperlukan untuk proses penelitian adalah:

1. Tikus usia 12-16 minggu, jantan, dan berat badan 150-250gram
2. Makanan ternak standar
3. Minuman standar dan Sonde

4.5 Intrumen penelitian

Alat – alat yang diperlukan dalam proses penelitian:

1. Kandang tikus dari plastik yang berisi sekam, tempat makanan, botol minum, dan ditutup atap kawat.
2. Timbangan Tanita[®] dengan skala gram dan tingkat ketelitian sampai dengan 0,1 gram.
3. Seperangkat alat bedah
4. Alat pembuatan sediaan histologis berupa mikrotom, gelas reagen, *object glass*, *deck glass*, *staining jar*, dan *tissue processor*.
5. Mikroskop cahaya Olympus[®] tipe CX41 dengan kamera OptiLab[®].
6. Bak air
7. Spuit 1 ml, 10 ml, dan 50 ml Onemed[®]
8. Sarung tangan
9. Buku tabel data
10. Mortir
11. ELISA kit: MDA dan SOD dari *Fine Test Laboratory*

4.6 Lokasi, Waktu Dan Etika Penelitian

4.6.1.Lokasi Penelitian

Persiapan penelitian dan pemberian perlakuan bertempat di *Laboratory Animal Unit* Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Bahan pengujian dari hewan coba berupa darah dan jantung tikus kemudian dikirim ke Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Udayana untuk pemeriksaan ELISA. Pemeriksaan histopatologis dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Berikut adalah lokasi dan peruntukkannya dalam pelaksanaan penelitian :

1. Kandang Hewan Percobaan *Laboratory Animal Unit* Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana sebagai tempat pemeliharaan hewan.
2. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana untuk pengambilan, fiksasi, dan pengeblokan (*embedding*) serta pemeriksaan histopatologi oleh 1 (satu) pakar.
3. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana untuk pemeriksaan histopatologi oleh 1 (satu) pakar.
4. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana sebagai tempat pelaksanaan pengujian metode ELISA. Pemeriksaan dilaksanakan oleh peneliti dan laboran dibawah bimbingan Kepala Bagian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

4.6.2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 sampai dengan bulan April 2017. Waktu penelitian dialokasikan sesuai dengan jadwal penelitian dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1. Jadwal penelitian

N o.	Jenis Kegiatan	Tahun 2016-2017 (Bulan)											
		10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Mengurus ijin penelitian												
2.	Menyiapkan instrumen penelitian												
3.	Melakukan analisis kebutuhan (<i>need analysis</i>) dan studi pendahuluan												
4.	Melakukan pretreatment bagi hewan coba penelitian												
5.	Melakukan perlakuan pada kelompok hewan coba												
6.	Melakukan pengukuran post test hewan coba												
7.	Analisis data dan penyusunan laporan												

4.6.3. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh *ethical approval* dari Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret No: 717/VIII/HREC/2016. Penelitian ini dilaksanakan pada hewan coba dengan menerapkan prinsip –prinsip sebagai berikut:

1. *Replacement* (menggantikan) ialah keperluan untuk membuktikan suatu hipotesis, bila diperlukan penggunaan hewan coba maka menggunakan hewan yang paling rendah tingkatannya dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction* (pengurangan) ialah mengembangkan strategi penggunaan hewan dalam jumlah yang lebih sedikit untuk menghasilkan data yang optimal yang diharapkan dari penelitian.

3. *Refinement* (memperhalus) ialah upaya melakukan modifikasi di dalam manajemen pemeliharaan atau prosedur tindakan penelitian sedemikian rupa sehingga dapat meningkatkan kesejahteraan hewan atau mengurangi atau menghilangkan rasa sakit dan stress pada hewan coba.

Ketiga prinsip etika ini dikombinasikan dengan prinsip kebebasan dalam kesejahteraan hewan yaitu:

1. *Freedom from hunger and thirst* (bebas dari rasa lapar dan haus) : dapat dilakukan dengan pemberian pakan minum ad libitum dan kemudahan hewan dalam mengakses pakan dan minum kapanpun mereka kehendaki.
2. *Freedom from discomfort* :dapat dilakukan dengan memperhatikan kebutuhan hewan terhadap tempat tinggal yang sesuai atau pemberian naungan atau sarang yang sesuai. Selain itu faktor lingkungan diperhatikan meliputi temperatur, kelembaban, ventilasi dan pencahayaan yang harus sesuai dengan kondisi alamiah hewan yang bersangkutan.
3. *Freedom from pain, injury and diseases* : dimana selama penelitian dijalankan program kesehatan yang telah ditetapkan, menggunakan sebisa mungkin teknik non-invasif, serta jika dibutuhkan haruslah menggunakan obat pengurang rasa sakit atau pematasi rasa dan selalu menggunakan metode euthanasia yang dianjurkan dan telah disetujui oleh komisi etik.
4. *Freedom from fear and distress* : dapat dilakukan dengan menghindari prosedur atau teknik yang menyebabkan rasa takut dan stres pada hewan dan memberikan masa transisi dan adaptasi sebelum penelitian berlangsung.

5. *Freedom to express natural behaviour* : dapat diupayakan melalui penyediaan luasan kandang yang cukup, kualitas kandang yang baik, dan teman dari hewan yang sejenis dengan memperhatikan sosialisasi, dan tingkah- laku spesifik.

4.7 Prosedur pengambilan dan pengumpulan data

Perlakuan olahraga yang diberikan adalah renang pada hewan coba tikus (Bogdanova *et al.*, 2013; Stanojevic *et al.*, 2016; Giri *et al.*, 2017)

4.7.1. Pemberian perlakuan

1. Kelompok kontrol: perlakuan pelatihan proporsional diberikan satu jam setelah makan dan minum, pada sore hari tikus direnangkan selama 15 menit, dengan frekwensi sekali sehari, direnangkan pada hari ke-1,2,4,5,7 setiap minggunya, dan pada hari ke-3 dan ke-6 adalah periode istirahat. perlakuan perenangan tersebut dilaksanakan selama delapan minggu. Pada akhir perlakuan tikus segera dikorbankan untuk diambil organ jantungnya.
2. Kelompok perlakuan *overtraining*. Perlakuan diberikan satu jam setelah makan dan minum, pada pagi dan sore hari tikus direnangkan dua kali setiap hari (kecuali di hari ke-7) sampai terjadi kelelahan dan tidak dapat berenang lagi (sesuai data pada studi pendahuluan peneliti maka diperoleh rerata waktu 45 menit), dan perlakuan ini diberikan selama selama delapan minggu. Pada akhir perlakuan tikus segera dikorbankan untuk diambil organ jantungnya.
3. Kelompok perlakuan *overtraining* dengan *recovery* tiga hari. Perlakuan diberikan satu jam setelah makan dan minum, pada pagi dan sore hari

tikus direnangkan dua kali setiap hari (kecuali di hari ke-7) sampai terjadi kelelahan dan tidak dapat berenang lagi (sesuai data pada studi pendahuluan peneliti maka diperoleh rerata waktu 45 menit), dan perlakuan ini diberikan selama delapan minggu. Setelah perlakuan tersebut tikus kemudian diberikan periode istirahat selama tiga hari kemudian segera dikorbankan untuk diambil organ jantungnya.

4. Kelompok perlakuan *overtraining* dengan *recovery* tujuh hari. Perlakuan diberikan satu jam setelah makan dan minum, pada pagi dan sore hari tikus direnangkan dua kali setiap hari (kecuali di hari ke-7) sampai terjadi kelelahan dan tidak dapat berenang lagi (sesuai data pada studi pendahuluan peneliti maka diperoleh rerata waktu 45 menit), dan perlakuan ini diberikan selama delapan minggu. Setelah perlakuan tersebut tikus kemudian diberikan periode istirahat selama tujuh hari kemudian segera dikorbankan untuk diambil organ jantungnya.

4.7.2. Prosedur Pengumpulan Data

Pada penelitian ini, untuk mendapatkan data *post test*, maka diambil dari bahan penelitian berupa miokardium dari masing –masing tikus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah semua tikus dikorbankan.

4.7.3. Pembuatan Preparat Histologis

Pembuatan preparat histologis dilakukan dengan cara membuat sayatan pada otot jantung dengan menggunakan mikrotom. Kemudian preparat diwarnai dengan teknik pewarnaan *Hematoksilin – Eosin (HE)* agar memudahkan pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali

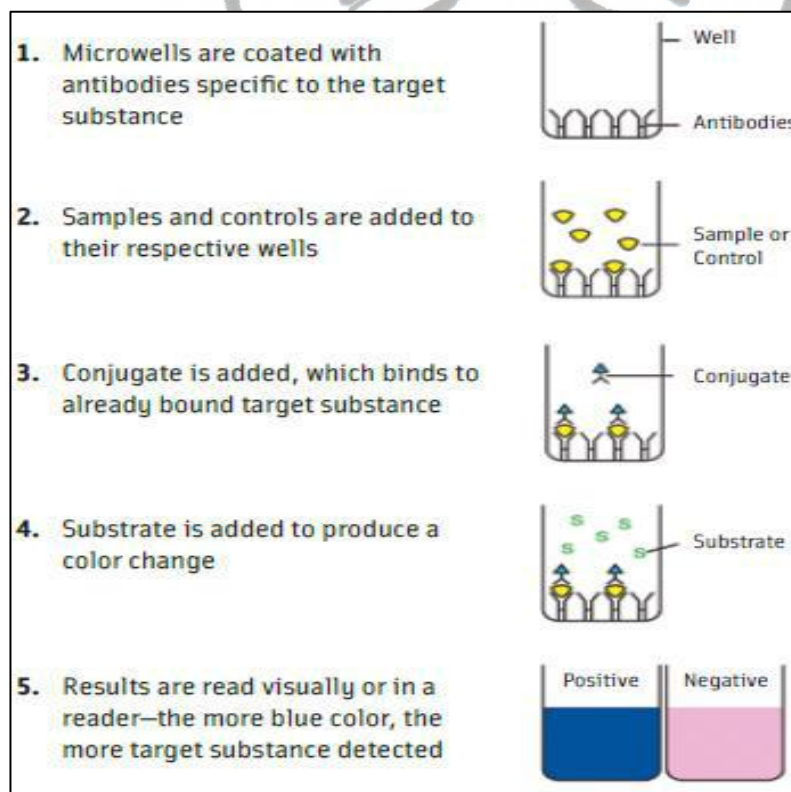
untuk menilai hipertrofi, nekrosis dan peningkatan aktivitas kromatin yang terjadi pada miokardium. Preparat diberikan pewarna Hematoksilin – Eosin (HE) dan direkatkan dengan *permount* :

1. Xylol I selama 5 menit.
2. Xylol II selama 5 menit.
3. Xylol III selama 5 menit.
4. Alkohol 100% I selama 5 menit.
5. Alkohol 100% II selama 5 menit.
6. Aquadest beberapa celup.
7. Harris-Haematoxylin selama 15 menit.
8. Aquadest selama 1 menit yang dicelup naik-turun.
9. Asam alkohol 1% sebanyak 5-7 celupan dan jangan sampai pucat.
10. Aquadest I selama 1 menit.
11. Aquadest II selama 15 menit.
12. Eosin selama 2 menit.
13. Alkohol 96% I selama 3 menit.
14. Alkohol 96% II selama 3 menit.
15. Alkohol 100% I selama 3 menit.
16. Alkohol 100% II selama 3 menit.
17. Xylol IV selama 5 menit.
18. Xylol V selama 5 menit.

4.7.4. Prosedur pemeriksaan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA merupakan teknik biokimia yang banyak digunakan di bidang imunologi untuk mendeteksi adanya antibodi atau antigen pada suatu sampel.

ELISA digunakan untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim sebagai reporter label. Terdapat beberapa jenis teknik ELISA, yaitu (1) *Indirect* ELISA; (2) *Direct* ELISA; (3) *ELISA Sandwich*; (4) *ELISA Multiplex*, dan (5) *ELISA Biotin Streptavidin*. Dalam penggunaan sehari-hari ELISA bisa digunakan untuk melabel suatu antigen atau mengetahui antibodi yang ada dalam tubuh. Apabila kita ingin mengetahui antigen apa yang ada di dalam tubuh, maka yang diendapkan adalah antibodinya, begitu pula sebaliknya jika ingin mengetahui antibodi maka yang diendapkan pada *well plate* adalah antigennya. Untuk mendeteksi konsentrasi protein dalam pemeriksaan ini yaitu MDA dan SOD mitokondria, maka digunakan teknik ELISA dengan mengedapkan antibodi pada *well plate*.



Gambar 4.2. Prinsip metode ELISA sandwich

Fungsi dari test ELISA yaitu bukan hanya untuk mengetahui keberadaan suatu antigen dengan antibodi tetapi juga untuk mengukur kadar antigen atau antibodi tersebut dengan menggunakan alat spektrofotometer. Spektrofotometer adalah sebuah alat yang dapat mengukur jumlah dari cahaya yang menembus sumuran dari *microplate*. Kompleks antigen-antibodi yang terjadi pada *well microplate* dan setelah pemberian substrat, enzim yang terikat pada antibodi ke dua pada kompleks antigen-antibodi yang terbentuk akan memberikan perubahan warna pada cairan tersebut, sehingga akan memberikan *optical density* yang berbeda. *Optical density* dapat dinyatakan meningkat atau menurun berdasarkan pengenceran material standar, sehingga akan menghasilkan kurva *dose-response* yang nantinya akan digunakan untuk mengestimasi kadar protein tersebut.

Langkah –langkah pemeriksaan dengan teknik ELISA dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel *miokardium*.

- a. Cuci jaringan dengan PBS dingin (0,01 M, pH=7,4) dan rendam dalam cairan PBS selama 60 menit.
- b. Cuci jaringan kembali dengan PBS dingin (0,01 M, pH=7,4) dan rendam selama 120 menit.
- c. Siapkan larutan PBS dingin yang telah ditambahkan dengan dengan larutan protease inhibitor.
- d. Ambil jaringan yang telah dicuci dengan PBS dan diiris dalam berat yang sama untuk masing-masing sampel (0,2 g)
- e. Jaringan (*miokardium*) dicincang dan digerus dengan mortir hingga homogen.

- f. Larutkan jaringan yang telah homogen dengan larutan PBS yang telah ditambahkan *protease inhibitor*.
- g. Larutan jaringan tersebut kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 5000xg untuk memperoleh supernata.

2. Pengenceran sampel dengan *Diluent Solution*

Untuk mendapatkan *high target protein concentration* (20000-200000pg/ml) maka formula pengencerannya dalanh 1:10. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan 1µl sampel kedalam 99 Sebanyak 99 1µl sampel/*standard dilution buffer*.

3. Pembuatan standard

Standard 7 = 8 µL Calibrator + 677 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 6 = 300 µL standard 7 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 5 = 300 µL standard 6 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 4 = 300 µL standard 5 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 3 = 300 µL standard 6 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 2 = 300 µL standard 3 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

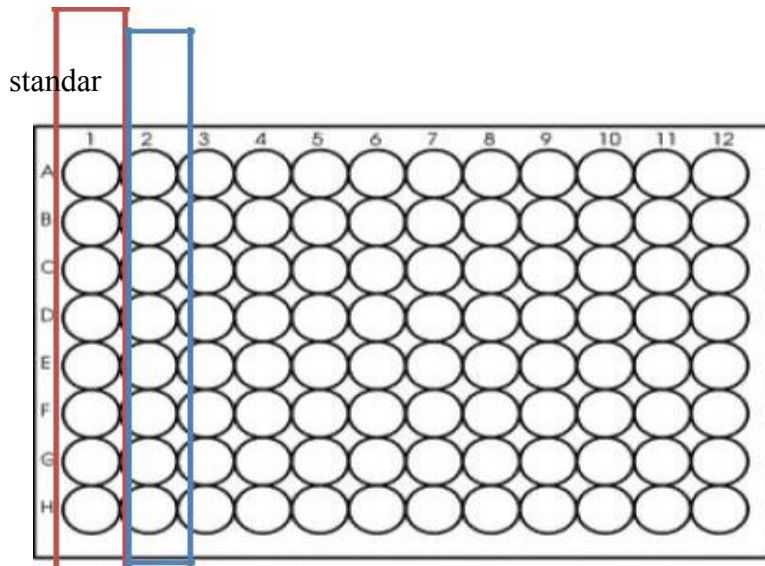
Standard 1 = 300 µL standard 2 + 300 µL Diluent 1X → sentrifugasi.

Standard 0 = 600 µL Diluent 1X.

4. Pemeriksaan pada *Well ELISA*

1. Dengan menggunakan mikropipet, dimasukkan Standard 7-0 ke dalam *well plate* kolom 1 (A-H) sebanyak 100 µL.
2. Dengan menggunakan mikropipet, dimasukkan Sampel 1-3 ke dalam *well plate* kolom 2 (A-H) sebanyak 100 µL.

3. Diinkubasikan pada suhu ruangan selama 60 ± 2 menit. Kemudian *plate* ditutup dengan plastik transparan (*plate sealer*) dan dalam posisi sejajar.



Gambar 4.3. Elisa Well Plate. Plate yang telah *dicoating* dengan antibody dari pabrik. *Standard* 0-7 dimasukkan masing ke dalam well A01-H01, sementara sampel 1 pada well A02, D02 dan G02; sampel 2 pada well B02, E02 dan H02; sampel 3 pada well C02 dan F02, dan seterusnya.

5. Menyiapkan *Wash Solution* sebanyak 100 ml.

Pencucian dilakukan dengan menyiapkan larutan *wash solution* dengan cara melarutkan 5 ml *Wash Solution* dengan 95 ml aquades.

6. Setelah selesai diinkubasi, *well plate* dicuci dengan larutan *Wash Solution* sebanyak 4 kali dengan menggunakan alat *Elisa Washer (Thermo Scientific™ Wellwash™ Microplate Washer)*

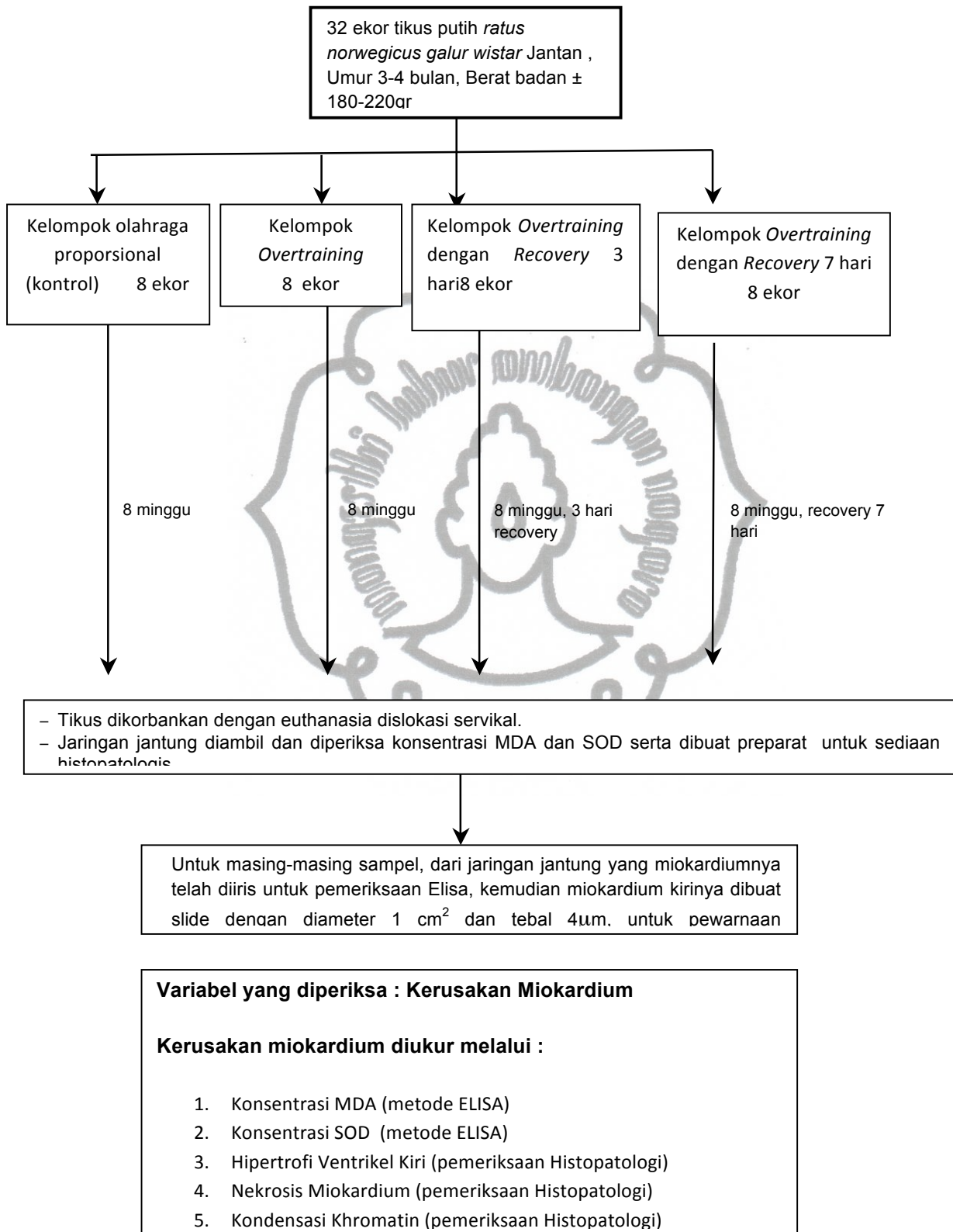
7. Preparasi 100x *enzyme-antibody conjugate (HRP Streptavidin Conjugate)* yang diencerkan menjadi 1x (dalam keadaan gelap).

8. Larutan tersebut dimasukkan ke masing-masing *well* 100 μ l enzim yang telah diencerkan. Kemudian tutup dengan aluminium foil sebagai *plate sealed* (dalam keadaan gelap) dan inkubasi selama 30 ± 2 menit.

9. Kemudian dilakukan pencucian kembali seperti langkah 6.
10. Ditambahkan 100 μL *TMB Substrate Solution* (*Chromogen-Substrate Solution*) pada masing-masing *well* dan inkubasi dengan suhu ruangan dan keadaan gelap selama 10 menit.
11. Kemudian ditambahkan 100 μL *Stop Solution* pada masing-masing *well*.
12. Langkah terakhir adalah seluruh *well* dimasukkan ke dalam *Elisa Reader* 450nm dan dilakukan pembacaan



4.8. Alur Penelitian



Gambar 4. 4. Alur Penelitian

4.9. Cara pengolahan dan analisis data

Data yang diperoleh dianalisis sebagai berikut:

1. Analisis deskriptif

Data dengan skala numerik yaitu konsentrasi MDA, SOD dan histopatologis hipertrofi patologis ventrikel kiri, nekrosis serta kondensasi kromatin diolah secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk nilai rerata dan standar deviasi.

2. Analisis normalitas dan homogenitas

Selanjutnya data dengan skala numerik diuji normalitas sebaran data dengan uji *Shapiro-Wilk*. Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Data hasil penelitian kemudian dianalisis apakah memiliki distribusi normal atau tidak secara statistik dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50.

- a. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dengan *Levene's test* digunakan untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama atau tidak.

- b. Uji Parametrik

Pada penelitian ini, didapatkan distribusi data normal dan varians data homogen maka data mengenai konsentrasi MDA, SOD, histopatologis hipertrofi patologis ventrikel kiri, nekrosis dan kondensasi kromatin kardiomyosit dari empat kelompok tidak berpasangan dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way*

ANOVA. Ditemukan adanya perbedaan yang bermakna melalui metode uji parametrik *one way ANOVA* maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Taraf kemaknaan yang digunakan adalah $\alpha=0,05$. Dengan demikian nilai secara statistik dinyatakan bermakna bila $p<0,05$. Analisis data dilakukan berbantuan program SPSS versi 20.0 *for Windows*. Berdasarkan adanya signifikansi pada uji *one way ANOVA* menghasilkan nilai $p<0,05$ (hipotesis dianggap bermakna), maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post-Hoc Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok yang lebih terinci sehingga didapatkan kelompok perlakuan mana yang mempunyai efek lebih baik. Kemudian dilanjutkan dengan uji regresi logistik digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh dari perlakuan *recovery* tiga hari dan *recovery* tujuh hari terhadap kerusakan miokardium.