

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian *true experiment*. Penelitian eksperimen merupakan satu-satunya jenis penelitian yang secara langsung mencoba untuk mempengaruhi suatu variabel tertentu. Penelitian ini juga merupakan jenis penelitian yang terbaik dalam pengujian hipotesis hubungan sebab akibat atau kausalitas (Fraenkel, 2012), dan dalam penelitian ini menggunakan desain *The Randomized Posttest-Only Control Group Design*. Dalam penelitian ini melibatkan empat kelompok yang dibentuk secara acak. Kelompok satu sebagai kontrol tidak diberi perlakuan olahraga dan tanpa paparan polusi (kontrol sehat), kelompok dua tanpa diberi perlakuan olahraga dengan paparan polusi, kelompok tiga diberi perlakuan olahraga dengan paparan polusi, dan kelompok empat diberi perlakuan olahraga tanpa paparan polusi. Setelah diberi perlakuan, hasil inflamasi paru dari keempat kelompok tersebut akan diukur dan dibandingkan hasilnya. Berikut ini desain dalam penelitian ini:

| | | | |
|---------|---|----------------|---|
| GROUP 1 | R | C | O |
| GROUP 2 | R | X ₁ | O |
| GROUP 3 | R | X ₂ | O |
| GROUP 4 | R | X ₃ | O |

Gambar 3.1 Desain Penelitian

Keterangan :

- R = Pemilihan sampel secara acak
- C = Kontrol tanpa olahraga dan tanpa paparan polusi
- X₁ = Eksperimen tanpa olahraga dengan paparan polusi
- X₂ = Eksperimen olahraga dengan paparan polusi
- X₃ = Eksperimen olahraga tanpa paparan polusi
- O = Pengukuran variabel dependen/inflamasi paru

Cecep Muhammad Alawi, 2021

PENGARUH OLAHRAGA DI RUANG TERBUKA DAN RUANG TERBUKA HIJAU TERHADAP INFLAMASI PARU PADA TIKUS GALUR WISTAR JANTAN

Universitas Pendidikan Indonesia : repository.upi.edu : perpustakaan.upi.edu

.3.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua subjek yang potensial bagi penelitian dimana sampel akan diambil (Gratton, Jones, & Jones, 2014). Pada penelitian ini populasi yang akan diteliti adalah tikus putih galur wistar jantan dewasa dengan berat 200-250 gram yang berusia 8-9 minggu sebanyak 24 ekor.

Sampel merupakan kumpulan unit atau kasus yang diambil dari populasi yang diteliti (Gratton et al., 2014). Secara spesifik, unit tersebut adalah yang memiliki ciri-ciri atau keadaan tertentu sesuai dengan yang akan diteliti. Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik *Total Sampling*. Teknik ini merupakan pengambilan sampel dimana jumlah sampel sama dengan jumlah populasi. Berdasarkan hal tersebut, sampel dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor tikus putih wistar jantan.

3.3 Instrumen Penelitian

3.3.1 Protokol Latihan

Dalam penelitian ini *treatment* latihan yang diberikan menggunakan lari didalam lintasan treadmill dan protokol sesuai penelitian sebelumnya. Protokol latihan yang digunakan adalah tikus beraktivitas fisik dengan intensitas *moderate training* yaitu berlari selama 30 menit dengan kecepatan 1.2 km/jam (20 m/menit). Latihan ini dilakukan sebanyak 5 kali per minggu selama 4 minggu. Protokol ini dapat digunakan untuk latihan daya tahan karena terbukti mampu meningkatkan fungsi jantung (Fenning et., al 2003).

3.3.2 Western Blotting

Inflamasi paru yang ditandai dengan IL-6 dan TNF- α akan diukur dengan menggunakan metode *Western Blotting*. *Western Blotting* merupakan suatu teknik untuk menandai suatu protein pada membran nitroselulosa, nilon, atau membran transfer lain setelah protein tersebut terpisahkan melalui elektroforesis. Protein tersebut kemudian dapat dideteksi melalui metode autoradiografi, pelabelan dengan senyawa-senyawa fluoresen, pelabelan dengan antibodi terikat protein, lektin atau

gen pengikat spesifik lainnya (Attwood, Campbell, Parish, Smith, & Stirling, 1998). Berdasarkan pengertian tersebut, *Western Blotting* dilakukan melalui beberapa tahap (Kindt, Goldsby, Osborne, & Kuby, 2010).

3.3.2.1 Tahap Pertama : persiapan pembuatan sampel

Larutan yang diperlukan:

1. Solution A : 250 mM sucrose, 5 mM NaN₃, 2 mM EGTA, 20 mM HEPES-Na, pH 7.4
2. Solution C : 1mM EDTA , 10 mM Tris , pH 7.4
3. 100uM PMSF
4. 10uM Leupeptin
5. 1 uM Pepstatin A

Langkah2-langkah pembuatan sampel paru:

1. Siapkan larutan Buffer yang berisi: Solution A + 10 ul/ml PMSF + 1 ul/ml leupeptin + 1 ul/ml pepstatin A.
2. Siapkan refrigeran sebagai alas
3. Tempelkan kertas parafin diatas refrigeran
4. Potong paru dari hasil harvest (di simpan pada suhu -800⁰ C.) sebesar 100 mg-250 mg
5. Potong menjadi potongan kecil dengan gunting
6. Masukkan dalam potter dan tambahkan solution yang sudah disiapkan (point 1) dengan pengenceran 20x. Contoh: paru 100 mg maka buffer yg diperlukan = 100 mg x 20 = 2000 ul.
7. *Homogenate* sampel paru pada kecepatan 1000 rpm dan sampel paru harus dalam keadaan suhu 40⁰ C (dalam es). *Homegenate* dilakukan dalam waktu 3 menit.

8. Kumpulkan supernatan hasil *homogenate* dalam tube
9. Beri tanda pada tutup tube

3.3.2.2 Tahap Kedua : membuat gel

Langkah selanjutnya adalah membuat gel yang akan digunakan dalam elektroforesis. Berikut langkah- demi langkah membuat gel yang baik:

1. Menyiapkan tempat yang akan digunakan untuk bekerja; semprotkan alkohol 70% dan seka dengan tisu pada semua permukaan area tempat kerja yang akan digunakan. Tempatkan selambar palstik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan kertas coklat/ *brown towel* di atasnya
2. Menyiapkan semua peralatan yang butuhkan seperti; *casting stand, glass plate sandwich, plastic comb, pipet, pipette tips*. Jangan lupa untuk menyekanya dengan alkohol 70%.
3. Siapkan semua larutan yang suah dibuat sebelumnya seperti; 1M Tris HCl (pH 8,6), 10% SDS, 30% *Acrylamide*, 10% APS, Milli-Q (dw)
4. Pasangkan *glass plate sandwich* pada *casting frame*. Pastikan untuk mengatur bagian permukaannya dengan rata. Kemudian kunci *casting frame* secara hati-hati. Tempatkan spoon abu-abu di bagian bawah *casting stand*, dan tempatkan plastik parafilm di atasnya. Kemudian pasang *casting frame* pada *casting stand* yang sudah disiapkan. Pastikan *casting frame* yang dipasangkan tidak bocor, dengan mengisinya dengan Milli-Q dan biarkan beberapa saat. Jika tidak ada kebocoran, buang Milli-Q lalu keringkan dengan kertas filter, dan *casting frame* siap digunakan untuk pembuatan gel.
5. Menyiapkan *lower/running gel* sesuai dengan konsentrasi gel yang diinginkan. Beberapa *running gel* yang menjadi pilihan:

Tabel 3.1 Konsentrasi *Running Gel*

| 15 | %Running gel,lower (for2gel) | | 10,5 | mL | x2 | |
|-------------|------------------------------|---------|--------|----|-------|----|
| Final conc. | | | | | | |
| 100 % | Dw | 11,1 % | 1,162 | mL | 2,324 | mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 | mL | 7,875 | mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 | µL | 210 | µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 15 % | 5,25 | mL | 10,5 | mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 35 | µL | 70 | µL |
| 100 % | TEMED | 0,1 % | 10,5 | µL | 21 | µL |

| 12,5 | %Running gel,lower (for2gel) | | 10,5 | mL | x2 | |
|-------------|------------------------------|---------|--------|----|-------|----|
| Final conc. | | | | | | |
| 100 % | Dw | 19,4 % | 2,037 | mL | 4,074 | mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 | mL | 7,875 | mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 | µL | 210 | µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 12,5 % | 4,375 | mL | 8,75 | mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 35 | µL | 70 | µL |
| 100 % | TEMED | 0,1 % | 10,5 | µL | 21 | µL |

| 10 | %Running gel,lower (for2gel) | | 10,5 | mL | x2 | |
|-------------|------------------------------|---------|--------|----|-------|----|
| Final conc. | | | | | | |
| 100 % | Dw | 27,7 % | 2,912 | mL | 5,824 | mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 | mL | 7,875 | mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 | µL | 210 | µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 10 % | 3,5 | mL | 7 | mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 35 | µL | 70 | µL |
| 100 % | TEMED | 0,1 % | 10,5 | µL | 21 | µL |

| 7,5 | %Running gel,lower (for2gel) | 10,5 | mL | x2 |
|-------------|------------------------------|---------|-----------|----------|
| Final conc. | | | | |
| 100 % | Dw | 36,1 % | 3,787 mL | 7,574 mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 mL | 7,875 mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 µL | 210 µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 7,5 % | 2,625 mL | 5,25 mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 35 µL | 70 µL |
| 100 % | TEMED | 0,1 % | 10,5 µL | 21 µL |

| 6 | %Running gel,lower (for2gel) | 10,5 | mL | x2 |
|-------------|------------------------------|---------|-----------|----------|
| Final conc. | | | | |
| 100 % | Dw | 41,1 % | 4,312 mL | 8,624 mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 mL | 7,875 mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 µL | 210 µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 6 % | 2,1 mL | 4,2 mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 35 µL | 70 µL |
| 100 % | TEMED | 0,1 % | 10,5 µL | 21 µL |

| 4,75 | %Running gel,lower (for2gel) | 10,5 | mL | x2 |
|-------------|------------------------------|---------|-----------|----------|
| Final conc. | | | | |
| 100 % | Dw | 57,83 % | 5,205 mL | 10,41 mL |
| 1 M | Tris-HCl (pH8.6 at R.T.) | 0,375 % | 3,9375 mL | 7,875 mL |
| 10 % | SDS | 0,1 % | 105 µL | 210 µL |
| 30 % | <i>Acrylamide</i> | 4,75 % | 1,425 mL | 2,85 mL |
| 10 % | APS | 0,03 % | 30 µL | 60 µL |
| 100 % | TEMED | 0,2 % | 18 µL | 36 µL |

6. Sesuaikan dengan berat molekul protein yang ingin dideteksi. Misalnya berat molekul protein sampel paru akan menggunakan 12,5% *running gel*, maka siapkan larutan sesuai dengan resep berikut;

100% Milli-Q 2,037 mL

1M Tris HCl (pH 8,6 at RT) 3,9375 mL

10% SDS 105 μ L

30% Acrylamide 4,375 mL

10% APS 35 μ L

100% TEMED 10,5 μ L

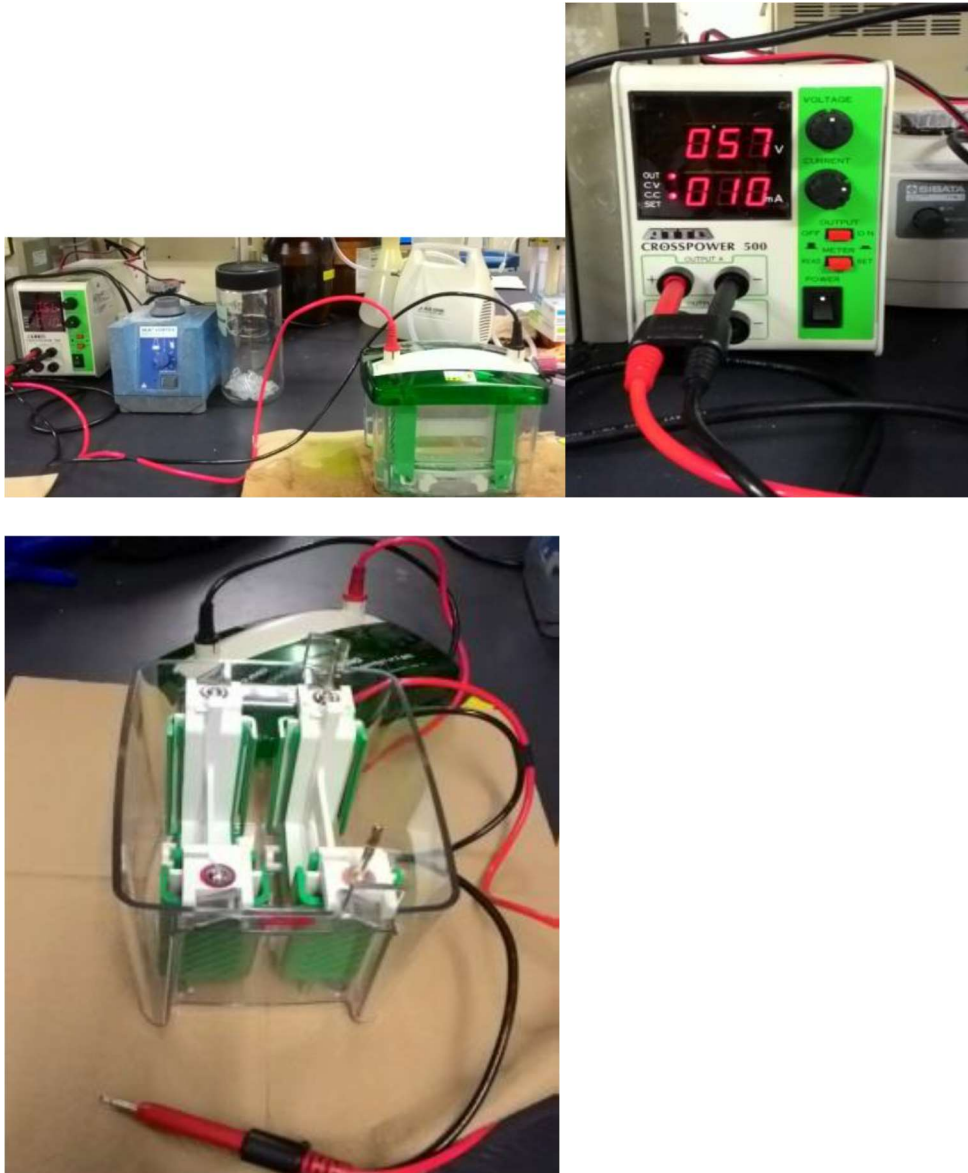
7. Campurkan semua *reagent* di atas secara berurutan, dalam tube 15 mL yang ditarus di atas es. Campur dengan pipet bagi *reagent* yang volumenya kecil untuk menjamin homogenitas. Sekali larutan telah dicampur dengan 100% TEMED, maka larutan *lower/running gel* segera dimasukkan ke dalam *cassete/ glass plate sandwich* menggunakan pipet. Hati-hati agar tidak ada gelembung udara di dalam gel. Masukkan larutan gel hingga batas yang telah ditentukan (lihat indikatornya). Tambahkan Buthanol (direkomendasikan) atau bisa juga Milli-Q di atas larutan *running gel* untuk menghindari adanya gelembung udara. Lalu biarkan beberapa saat (\pm 30 – 60 menit)

8. Setelah gel terbentuk, dapat dilanjutkan dengan melakukan elektroforesis. Jika waktu tidak memungkinkan, maka gel dapat disimpan pada suhu 4^o C dengan dibungkus dengan *brown towel* yang dibasahi milli-Q dan disemprot sedikit alkohol 70%, dan bungkus lagi dengan plastik wrap

3.3.2.3 Tahap Ketiga : elektroforesis

Elektroforesis merupakan pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul dalam suatu tegangan listrik tertentu. Berikut langkah demi langkah melakukan electrophoresis yang perlu diperhatikan:

1. Menyiapkan tempat yang akan digunakan untuk bekerja. Semprotkan alkohol 70% dan seka dengan tisu pada semua permukaan area tempat kerja yang akan digunakan. Tempatkan selimut plastik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan *brown towel* di atasnya.
2. Siapkan alat untuk elektroforesis (alat hijau dengan elektroda) bila hanya 1 gel pilih yang ada besi ke atas
3. Tuangkan washing buffer sampai tanda = 2 gel =, kemudian isi larutan di tengah gel dengan larutan washing buffer. Washing buffer = 60 mL + 540 mL mili-Q
4. Ambil sampel + protein marker (Multi Code Dyna III). (APS α Y)
5. Mulai masukan marker terlebih dahulu ke dalam gel line sebanyak 5 μ L
6. Kemudian diikuti dengan memasukan 5 μ L atau sejumlah sampel yang diinginkan (d disesuaikan dengan hasil protein assay) ke dalam line
7. Setelah semua sampel dimasukan, tutup mesin elektroforesisnya dan sambungkan soket (merah ► merah, dan hitam ► hitam)
8. Atur arus listrik = 10 mA (untuk 1 gel), tegangan listrik max untuk selama di stacking gel (\pm 20 – 30 menit)
9. Jika sampel sudah mencapai running gel, naikan arus listrik menjadi dua kali lipat menjadi 20 mA (\pm 30 – 45 menit)
10. Matikan mesin elektroforesisnya jika band terlihat sudah mencapai bagian bawah dari running gel



Gambar 3.2 Alat Elektroforesis

3.3.2.4 Tahap Keempat : pemindahan protein

Pemindahan ini menggunakan arus listrik sebagai faktor pendorong transfer protein. Oleh karena itu, proses pemindahan tersebut disebut juga elektrotransfer. Elektrotransfer dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu *blocking* semi kering dan *blocking* basah.



Gambar 3.3 Alat Elektrotransfer

Transfer protein dari gel poliakrilamid menuju gel transfer merupakan tahap yang sangat penting dalam *Western Blotting*. Oleh karena itu, ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam proses transfer protein tersebut. Arus listrik yang digunakan harus diperhatikan karena arus yang terlalu tinggi dapat menghasilkan panas selama transfer yang dapat menimbulkan masalah. Kekuatan ion yang rendah buffer transfer yang rendah dapat digunakan pada tegangan listrik yang tinggi tanpa perlu dikhawatirkan menghasilkan panas yang tinggi. Salah satu arus listrik yang dapat digunakan adalah 200 mA selama 2 jam. Untuk transfer protein dengan ukuran molekul besar, penggunaan gel dengan konsentrasi poliakrilamid yang rendah. Langkah selanjutnya adalah melakukan transfer gel ke membran. Berikut langkah demi langkah melakukan transfer yang perlu diperhatikan:

1. Sementara menunggu jalannya electrophoresis, siapkan larutan transfer (A, B, dan C simpan pada suhu ruangan);

Larutan A: 300 mM Tris, 5% methanol

Tris 0,3 g

Methanol 5 mL

Milli-Q

Total 100 mL

Larutan B: 25 mM Tris, 5% methanol

Tris 3,63 g

Methanol 5 mL

Milli-Q

Total 100 mL

Larutan C: 25 mM Tris, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 5% methanol

Tris 3,63 g

6-aminohexanoic acid 0,525 g

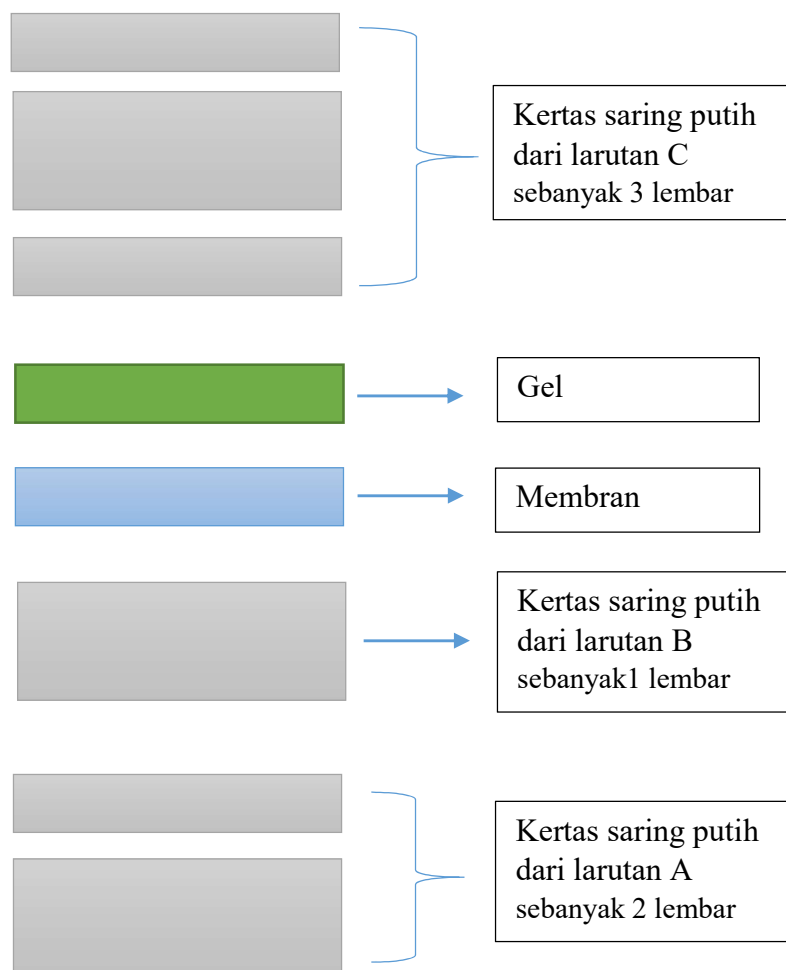
Methanol 5 mL

Milli-Q

Total 100 Ml

2. Menyiapkan PVDF membrane dan kertas saring.

- 1) Ambil membrane dengan pinset, masukan membrane ke methanol (5 menit) kemudian pindahkan ke solution B, goyangkan 30 menit
- 2) Ambil kertas putih = 3 lembar masukan ke larutan C (rendam selama 5 menit)
- 3) Ambil kertas putih = 1 lembar masukan ke larutan B (rendam selama 5 menit)
- 4) Ambil kertas putih = 2 lembar masukan ke larutan A (rendam selama 5 menit)
- 5) Buat sandwich dengan susunan:



3. Jika elektroforesis telah selesai, maka akan dilanjutkan dengan proses transfer dengan menggunakan mesin blotting. Atur *sandwich paper* seperti pada gambar di atas. Hindari membuat gelembung udara pada *sandwich* yang dibuat
4. Lakukan proses transfer (*Western Blotting*) dengan mengatur tegangan listrik pada tegangan maksimum, dan arus listrik pada 77 mA/gel selama 45 menit.
5. Setelah melakukan transfer, potong dengan menggunakan gunting untuk memisahkan bend protein sampel dan *loading control*. Pemisahan ini dilakukan berdasarkan berat molekul dari masing-masing protein yang ingin

dideteksi. Sesuaikan letaknya dengan melihat indikator marker yang digunakan

6. Cuci membran dengan TBS-T sebanyak 3 X 5 menit sambil digoyang

7. Blok membran dengan *blocking buffer* (skim milk) selama 60 menit pada suhu ruangan sambil digoyang. 5% skim milk (Skim milk = 5 g larutkan ke dalam 100 mL TBS-T)

8. Kemudian cuci membran dengan TBS-T sebanyak 3 X 10 menit.

9. Lanjutkan dengan menginkubasi membran dengan antibodi primer selama \pm 12 jam (semalaman). Inkubasi dilakukan pada suhu 4°C sambil digoyang. (Tingkat pengenceran antibody primer : x 500~10000).

3.3.2.5 Tahap Kelima : deteksi protein

Deteksi protein ini memanfaatkan interaksi antara antigen dan antibodi yang bersifat spesifik. Variasi metode-metode tersebut terutama terletak pada penggunaan antibodi primer dan sekunder, serta penggunaan molekul penanda. Berikut langkah demi langkah melakukan deteksi yang perlu diperhatikan:

1. Setelah membran diinkubasi semalaman dengan antibodi primer, cuci membran tersebut dengan TBS-T sebanyak 3 X 10 menit. Catatan: larutan antibodi primer masih dapat dipakai berulang-ulang sehingga kita dapat menyimpannya kembali

2. Siapkan antibodi sekunder. Tingkat pengenceran secondary antibody: x 20000, Dilution buffer: 5% BSA or 5% skim milk in TBST. Dalam menyiapkan antibodi sekunder, kita harus hati-hati dalam menentukan antibodi sekunder mana yang harus digunakan. Apakah anti-rabbit atau anti-mouse. Pastikan kita mengetahuinya dengan melihat pada informasi produk antibodi yang kita beli untuk digunakan. Contoh:

1. Menyiapkan secondary antibody untuk COX-IV;

| | |
|--------------|------------|
| 5% Skim Milk | 10 mL |
| Anti-Rabbit | 10 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 10,010 mL |

2. Menyiapkan secondary antibody untuk All Myosin Heavy Chain;

| | |
|--------------|------------|
| 5% Skim Milk | 10 mL |
| Anti-Mouse | 10 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 10,010 mL |

3. Menyiapkan secondary antibody untuk α -tubulin;

| | |
|--------------|------------|
| 5% Skim Milk | 10 mL |
| Anti-Mouse | 10 μ L |
| <hr/> | |
| Total | 10,010 mL |

3. Setelah pencucian dengan TBS-T 3x10 menit selesai, tambahkan antibodi sekunder untuk setiap membran sesuai dengan spesifikasi antibodi sekundernya. Lalu inkubasi sambil digoyang selama 1 jam pada suhu ruangan

4. Setelah 1 jam, cuci lagi membran tersebut dengan TBS-T 3 x 10 menit.

5. Sambil dicuci, siapkan larutan pewarna yaitu Amersham ECL series (GE Healthcare) atau Ez WestLumi plus (ATTO), etc... (1:1) ;

Brown bottle (solution A) 200 μ L

White bottle (solution B) 200 μ L

Total 400 μ L per membran

Jumlah total larutan disesuaikan dengan ukuran membran. Sebagai rekomendasi, jika ukuran membran besar maka total larutan sebaiknya

berkisar 500 – 600 μ L, jika ukuran membran lebih kecil maka 300 – 400 μ L sudah cukup untuk pewarnaan

6. Ambil larutan pewarna (ECL atau ATTO) dengan pipet dan tempatkan pada plastik (sudah dilap dengan alkohol) yang telah disiapkan di atas meja, kemudian ambil membran dengan pinset dan taruh pada larutan tersebut dan diamkan selama 1 menit (ATTO) atau 5 menit (ECL)

7. Setelah waktunya, dengan pinset ambil membran tersebut dan taruh pada plastik yang telah disiapkan sesuai ukuran membran. Roll atau lap permukaan plastik tersebut untuk menghindari gelembung udara dan larutan yang berlebihan

8. Hidupkan Microchemi dengan menekan tombol ON yang berada dibelakang alat, kemudian tekan tombol ON yang ada di depan. Lalu hidupkan komputernya.

9. Double klik pad “Gel Capture” untuk membuka programnya, kemudian tunggu selama 15 hingga 30 menit sampai siap untuk digunakan. Catatan: langkah 8 dan 9 sebaiknya telah dilakukan terlebih dahulu ketika selesai menginkubasi membran dengan antibodi sekunder.

10. Tarik tempat sampel pada microchemi untuk membukanya, lalu tempatkan membran pada bagian tengah tempat sampel pada microchemi, dan tutup kembali dengan mendorongnya kembali pada tempat semula.

11. Klik “Auto”, kemudian klik “Start”. Dan tunggu hingga mesinnya bekerja

12. Setelah itu, pilih “quantity” pada jendela yang muncul segera setelah mesin bekerja untuk mendeteksi signal pada membran, kemudian klik “OK”. Lalu tunggu....

13. Sinyal protein yang dibaca akan muncul. Untuk menyimpannya, klik “File”, lalu klik “save Image” simpan dengan penamaan sesuai tanggal dan nama protein.

14. Kemudian klik lagi “File”, lalu klik “Save with reference”, lalu hidupkan lampu dengan menekan tombol “light” pada microchemi, lalu klik “OK”. Atur pencahayaannya sehingga dapat mendeteksi band-nya marker, setelah marker terlihat baik, maka klik “Copy Invert”, dan jika sudah puas dengan hasil gambarnya, klik “Done”

15. Matikan lampunya, kemudian klik “OK”

16. Keluarkan sampel membrannya dari dalam Microchemi, dan tutup kembali

17. Matikan Microchemi dan komputernya. Jangan lupa untuk mengopi file hasil protein detection tadi pada flachdisc untuk selanjutnya dianalisis dengan “imageJ”.



Gambar 3.4 Alat Deteksi Protein

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemeliharaan hewan coba sebelum diberi perlakuan

1. Tikus disiapkan sebanyak 24 ekor dengan berat 200-250 gram yang berusia 8-9 minggu sebagai sampel penelitian
2. Tikus dimasukkan ke dalam kandang bersih dengan ukuran panjang 70 cm x lebar 50 cm x tinggi 55 cm dan kapasitas kandang dapat digunakan maksimal 6 ekor per kandang.

3. Pemeliharaan kandang setiap 3x seminggu dilakukan penggantian sekam pengalas kandang tikus, serta tikus diberi pakan standar dan diberi minum ad libitum.
4. Penerangan diatur bergantian setiap 12 jam, kelembaban dan suhu diatur sedemikian rupa sehingga hewan coba merasa nyaman. Adaptasi kandang dilakukan 1 minggu, sedangkan adaptasi olahraga (*running exercise*) dilakukan selama 2 minggu dengan peningkatan bertahap lama dari olahraga lari yang diberikan.

3.4.2 Pemeliharaan hewan coba selama perlakuan

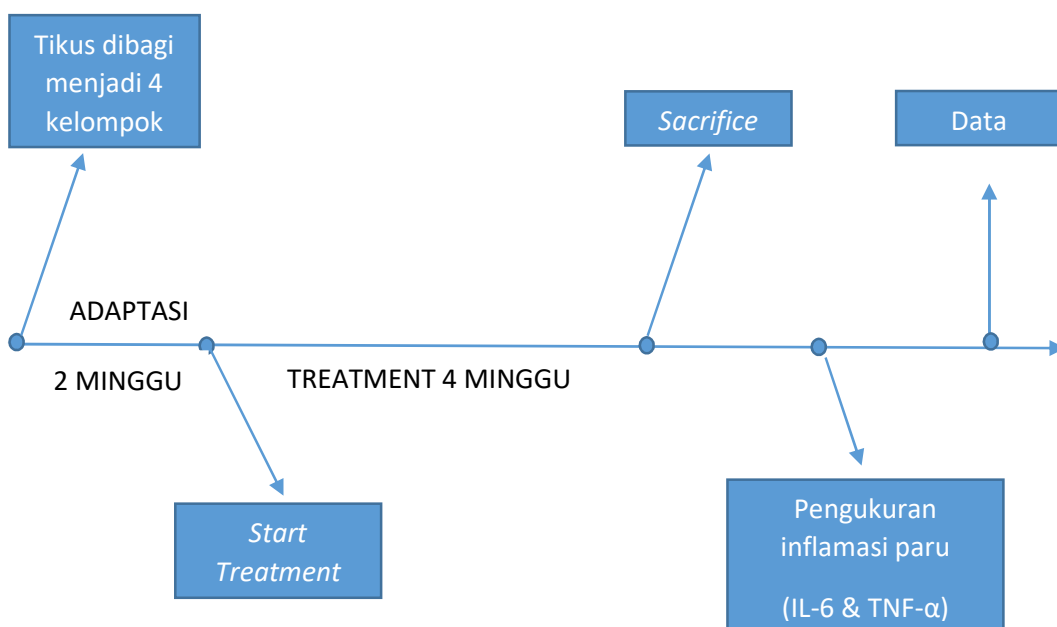
1. 24 hewan coba di bagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka tanpa paparan polusi, kelompok kontrol tanpa olahraga dan tanpa paparan polusi, kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka dengan paparan polusi, dan kelompok kontrol tanpa olahraga dengan paparan polusi.
2. Pada kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka tanpa paparan polusi, sampel melakukan olahraga lari dengan intensitas moderat selama 30 menit dengan kualitas udara baik dan tanpa paparan polusi. Latihan dilakukan pada lintasan treadmill dengan ukuran panjang 80 cm x lebar 10 cm dengan kecepatan 20 m/s. Latihan diberikan selama 5 kali per minggu selama total pemberian latihan adalah 4 minggu.
3. Pada kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka dengan paparan polusi, sampel melakukan olahraga lari dengan intensitas moderat selama 30 menit, namun dengan paparan polusi serta kualitas udara yang buruk. Selama latihan, paparan polusi dipertahankan dengan menggunakan indikator *Particulate Matter 2.5* >75 ppm dan *Carbon Monoxide Meter* <100 ppm. Latihan diberikan selama 5 kali per minggu selama total pemberian latihan adalah 4 minggu.
4. Pada kelompok kontrol tidak diberikan latihan, namun pada kelompok kontrol dengan paparan polusi tetap diberikan polusi bersamaan dengan kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka dengan paparan polusi.

5. Berat badan di ukur dua hari sekali pada pagi hari sebelum dilakukan perlakuan

3.4.3 Pemeliharaan hewan coba setelah perlakuan

1. Setelah di berikan perlakuan selama 28 hari, hewan akan dianestesi dengan isoflurane kemudian didislokasi servikal, setelah itu diambil darah melalui jantung serta paru diambil dan di simpan dalam larutan nitrogen untuk kemudian di bekukan dalam freezer -80°C . Setelah darah dan paru diambil dilakukan terninasi dengan pengangkatan organ jantungnya.

2. Setelah organ-organ sampel diambil, akan dilakukan pengukuran kadar stres oksidatif dan inflamasi paru menggunakan *Western Blotting*.



Gambar 3.5 Alur Waktu Penelitian

3.5 Analisis Data

Data yang dianalisis pada penelitian ini menggunakan ANOVA dua jalur untuk mengetahui pengaruh dan perbandingan pada empat kelompok sampel. Analisis data menggunakan program *Statistical Product for Social Science (SPSS)* Seri 16. Setelah memperoleh data, selanjutnya data tersebut diolah dan dianalisis, dengan tujuan dapat memperoleh kesimpulan penelitian. Dalam tahapannya, melalui tahapan sebagai berikut :

1. Deskriptif Data

Deskriptif data merupakan tahapan pengolahan untuk memperoleh informasi mengenai data, diantaranya rata-rata, standar deviasi, skor terendah dan skor tertinggi

2. Uji Normalitas

Uji normalitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data berada pada taraf distribusi normal atau tidak. Uji normalitas data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dengan asumsi kelompok sampel termasuk ke dalam sampel kecil atau 30 kebawah. Format pengujiannya dengan membandingkan nilai probabilitas (p) atau signifikansi (Sig.) dengan derajat kebebasan (dk) $\alpha = 0,05$. Uji kebermaknaannya adalah sebagai berikut :

- a) Jika nilai Sig. Atau $P\text{-value} > 0,05$ maka data dinyatakan berdistribusi normal.
- b) Jika nilai Sig. Atau $P\text{-value} < 0,05$ maka data dinyatakan berdistribusi tidak normal.

Jika data dinyatakan berdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan uji homogenitas dan memenuhi syarat untuk dilakukan menggunakan uji statistik parametrik. Namun jika data berdistribusi tidak normal, maka alternatif solusi yang dapat dipakai adalah dengan melakukan transformasi data, lalu melakukan uji normalitas ulang dengan data transformasi tersebut. Jika hasilnya masih tidak normal, maka pengujian beralih ke statistik non-parametrik.

3. Uji Homogenitas

Setelah diketahui bahwa data berdistribusi normal, maka selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Uji homogenitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data variannya sama atau tidak, uji homogenitas dilakukan sebagai prasyarat dalam ANOVA. Adapun dasar pengambilan keputusan dalam uji homogenitas adalah :

- 1) Jika nilai Sig. Atau *P-value* $> 0,05$ maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah homogen
- 2) Jika nilai Sig. Atau *P-value* $< 0,05$ maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak homogen.
- 4) ANOVA Dua Jalur

ANOVA merupakan singkatan dari “*analysis of varian*”. *Analysis of Varian* adalah salah satu uji komparatif yang digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata data lebih dari dua kelompok. Pada penelitian ini menggunakan ANOVA dua arah, yaitu analisis varian yang digunakan untuk menguji hipotesis perbandingan dua sampel atau lebih dan setiap sampel terdiri atas dua jenis atau lebih secara bersamaan. Pedoman pengambilan keputusan dalam uji ini adalah sebagai berikut :

1. H_0 : Jika nilai Sig. atau *P-value* $> 0,05$ maka dinyatakan tidak terdapat pengaruh interaksi antar variabel
2. H_1 : Jika nilai Sig. atau *P-Value* $< 0,05$ maka dinyatakan terdapat terdapat pengaruh interaksi antar variabel

Jika hasil uji menunjukkan H_0 diterima maka uji *Post-Hoc Test* tidak dilakukan, namun jika hasil uji menunjukkan H_0 ditolak maka uji *Post-Hoc Test* dilakukan untuk melihat kelompok mana saja yang berbeda.