

BAB IV

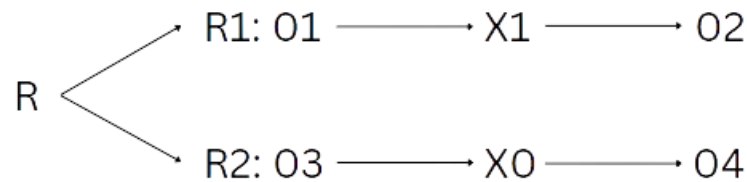
METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental, karena tidak hanya berfokus pada deskripsi variabel penelitian, melainkan untuk menganalisis bagaimana variabel bebas yang dimanipulasi dapat memengaruhi variabel terikat (Akbar dkk., 2022). Penelitian ini memiliki tujuan lebih dari sekadar melihat gambaran kadar MDA pada tikus Wistar. Melalui variabel bebas, yaitu “Dosis Pemberian Jus Stroberi,” peneliti akan menganalisis bagaimana dosis pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) yang berbeda (3 g/kg BB dan 6 g/kg BB) dapat memengaruhi kadar MDA pada tikus Wistar yang telah diinhalasi asap rokok elektrik.

Desain penelitian yang diterapkan dalam penelitian ini yaitu *Pre and Post-Test Control Group*, yang menggambarkan pendekatan eksperimental dengan melibatkan kelompok kontrol. Fungsi kelompok kontrol adalah sebagai pembandingan kadar MDA awal sebelum pemberian intervensi. Pada penelitian ini, sampel dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu P1 (kelompok kontrol), P2, dan P3. Paparan asap rokok elektrik dilakukan pada seluruh kelompok sebelum intervensi jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) pada hari ke-8 hingga hari ke-21. Hari ke-23 hingga hari ke-36, kelompok kontrol (P1) hanya diberikan air mineral, sementara P2 dan P3 menerima jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) selama 14 hari. Kadar MDA diukur sebelum intervensi jus stroberi (*Pre-Test*) pada hari ke-22 dan setelah intervensi jus stroberi (*Post-Test*) pada hari ke-36. Selama penelitian, tikus Wistar

tetap diberikan pakan dan minum standar untuk menerapkan prinsip etik hewan coba.

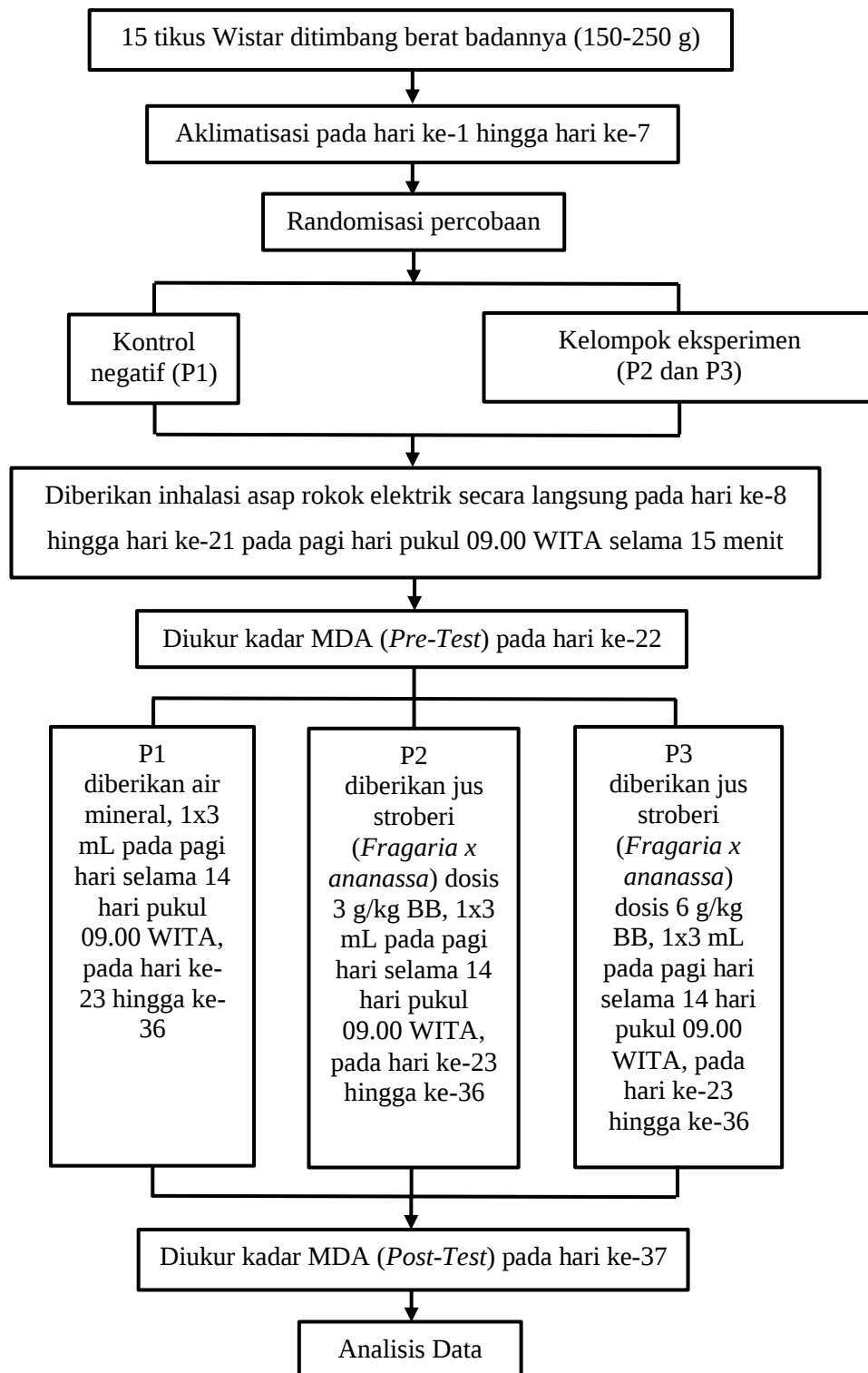


Gambar 9. Desain Penelitian *Pre-Test and Post Test Control Group*
Sumber: Diolah Penulis (2024)

Keterangan:

- R : Randomisasi sampel
- R1 : Sampel kelompok eksperimen (intervensi inhalasi asap rokok elektrik)
- R2 : Sampel kelompok kontrol (intervensi inhalasi asap rokok elektrik)
- O1 : *Pre-Test* kelompok eksperimen (kadar MDA sebelum diberikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dosis 3 g/kg BB dan 6 g/kg BB)
- O2 : *Post-Test* kelompok eksperimen (kadar MDA setelah diberikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dosis 3 g/kg BB dan 6 g/kg BB)
- O3 : *Pre-Test* kelompok kontrol (kadar MDA sebelum diberikan air mineral)
- O4 : *Post-Test* kelompok kontrol (kadar MDA setelah diberikan air mineral)
- X1 : Pemberian perlakuan/intervensi (jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dosis 3 g/kg BB dan 6 g/kg BB)
- X0 : Pemberian perlakuan kepada kelompok kontrol (air mineral)

B. Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian

Sumber: Diolah Penulis (2024)

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua lokasi yang berbeda untuk memastikan validitas dan representativitas hasil. Pertama, dilakukan di Laboratorium Kimia Terapan Politeknik Kesehatan Kemenkes Denpasar, yang terletak di Jalan Sanitasi No. 1, Sidakarya. Laboratorium ini merupakan lingkungan yang relevan untuk melakukan analisis kimia terkait variabel penelitian, yaitu kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar. Penelitian juga melibatkan fasilitas *Bio Mice and Rat* di Pulau Moyo, Pedungan. Lokasi ini dipilih sebagai lokasi untuk menginhulasi asap rokok elektrik dan pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) kepada tikus Wistar yang akan dijadikan subjek penelitian. *Bio Mice and Rat* dipilih karena dapat memberikan lingkungan yang terisolasi dan terkendali untuk mengontrol paparan asap rokok elektrik dan pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) pada tikus Wistar.

Penelitian ini dilakukan dalam periode Februari hingga Maret 2024. Dalam jangka waktu ini, berbagai proses pengumpulan data, perlakuan, observasi, dan analisis dilakukan untuk mencapai tujuan penelitian.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh kelompok tikus Wistar yang ada di fasilitas *Bio Mice and Rat*. Keputusan untuk menggunakan tikus Wistar sebagai subjek penelitian ini karena kemiripan struktur dan fungsi organ tubuh dengan manusia, sehingga tikus Wistar menjadi subjek yang baik untuk mengevaluasi dampak dari paparan berbagai agen terhadap kesehatan (Doncheva *et al.*, 2021).

2. Sampel

a. Unit analisis

Unit analisis adalah setiap individu tikus Wistar yang akan menjadi subjek utama penelitian. Hal ini berarti, setiap tikus Wistar yang dipilih untuk diambil sampel akan menjadi unit analisis yang dianalisis untuk melihat perbedaan kadar Malondialdehid (MDA).

b. Jumlah dan besar sampel

Jumlah dan besar sampel merujuk pada jumlah tikus Wistar yang diambil sebagai sampel dari populasi. Penentuan jumlah dan besar sampel ini penting karena akan memengaruhi validitas dan keakuratan hasil penelitian. Besarnya sampel ditentukan oleh pertimbangan statistik dan sumber daya yang tersedia. Besar sampel dihitung menggunakan rumus *Federer* (Moleong, 2020)

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

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

$$2n-2 \geq 15$$

$$n \geq 8,5 \text{ (dibulatkan menjadi 9)}$$

Keterangan:

n = Besar sampel per kelompok

t = Jumlah kelompok (3 kelompok: P0, P1, dan P2)

Berdasarkan rumus di atas, diperlukan minimal 9 ekor tikus Wistar pada setiap kelompok perlakuan. Hasil perhitungan besar sampel tersebut bertolak belakang dengan penelitian Arifin *and* Zahiruddin (2017) yang merekomendasikan jumlah penggunaan tikus Wistar dalam penelitian eksperimen minimal 5 hingga 7 tikus Wistar per kelompok percobaan. Rekomendasi ini didasarkan pada alasan

perhitungan statistik, keandalan hasil, dan kesejahteraan hewan percobaan. Berlatarkan hasil penelitian tersebut, penulis akan menggunakan 5 ekor tikus Wistar per kelompok percobaan dengan alasan kesejahteraan hewan percobaan, sehingga total sampel yang digunakan adalah 15 sampel tikus Wistar terbagi ke dalam 3 kelompok. Untuk mengantisipasi kekurangan data akibat *drop out*, maka adanya kemungkinan penambahan sampel sebagai cadangan sebesar 1 ekor per kelompoknya yang akan digunakan saat *drop out* terjadi.

Merencanakan jumlah dan besar sampel diperlukan pertimbangan akan kriteria inklusi, kriteria eksklusi, serta potensi peristiwa *drop out*. Kriteria inklusi membantu menentukan subjek yang memenuhi syarat untuk menjadi sampel, sementara kriteria eksklusi mengidentifikasi individu yang tidak sesuai dengan tujuan penelitian. Potensi peristiwa *drop out* diperhitungkan untuk memastikan bahwa ukuran sampel yang direncanakan memadai.

1) Kriteria inklusi

- a) Tikus putih (*Rattus novergicus* galur Wistar).
- b) Jenis kelamin jantan.
- c) Usia 8-10 minggu.
- d) Berat badan 150-250 g.

2) Kriteria ekskulsi

- a) Tikus cacat.
- b) Tikus terluka.
- c) Tikus tampak tidak aktif.

3) *Drop out*

Tikus mati selama perlakuan.

c. Teknik pengambilan sampel

Penelitian ini menerapkan pendekatan *simple random sampling*. Metode sampel acak sederhana sebagaimana dijelaskan oleh Sugiyono (2017), melibatkan pengambilan anggota sampel dari populasi dengan cara yang acak dan tanpa memperhatikan strata yang ada dalam populasi tersebut. Dalam pengambilan sampel acak sederhana, setiap anggota populasi memiliki peluang yang sama untuk dipilih menjadi sampel. Konsep dasar di balik sampel acak sederhana adalah menghindari bias dalam pengambilan sampel, sehingga hasil dari sampel tersebut dapat mewakili populasi secara lebih objektif. Metode ini berguna dalam situasi di mana tidak ada informasi khusus tentang populasi atau struktur dalam populasi yang ingin dipertimbangkan dalam pengambilan sampel.

Simple random sampling dalam studi ini dilakukan dengan mengelompokkan seluruh sampel tikus Wistar yang ada menjadi empat kelompok perlakuan. Metode ini memastikan bahwa setiap tikus memiliki peluang yang setara untuk dimasukkan ke dalam semua kelompok perlakuan. Proses *simple random sampling* dijalankan dengan langkah-langkah berikut:

- 1) Setiap unit percobaan (tikus) diberikan nomor urut mulai dari 1 hingga 15.
 - 2) Angka acak diambil dari unit percobaan, dengan menggunakan rumus *RAND* pada *Microsoft Excel*.
 - 3) Angka acak yang diperoleh diurutkan menjadi peringkat sesuai nilai acaknya.
- Hasil ini digunakan untuk menentukan urutan tikus dalam perlakuan.

Tabel 5. Hasil Perangkingan Angka *Random*

No	Kelompok	Angka <i>Random</i>	Rank
1	P11	257	5
2	P12	243	4
3	P13	407	10
4	P14	415	11
5	P15	436	14
6	P21	385	7
7	P22	390	9
8	P23	428	13
9	P24	102	1
10	P25	389	8
11	P31	233	3
12	P32	205	2
13	P33	456	15
14	P34	319	6
15	P35	427	12

Sumber: Diolah Penulis (2023)

Keterangan:

1, 2, 15 = nomor

P11, P25, P35 = kelompok perlakuan

257, 243, 427 = angka *random*

5, 4, 12 = satuan percobaan

- 4) Hasil randomisasi menunjukkan bahwa perlakuan P1 diberikan pada satuan percobaan bernomor 5, 4, 10, 11, dan 14. Perlakuan P2 diberikan pada satuan percobaan bernomor 7, 9, 13, 1, dan 8. Perlakuan P3 diberikan pada satuan percobaan bernomor 3, 2, 15, 6, 12.
- 5) *Input* kelompok perlakuan pada satuan percobaan ke dalam desain *lay out*.

Tabel 6. *Lay Out Rancangan Acak Penelitian*

P11 5	P12 4	P13 10	P14 11	P15 14
P21 7	P22 9	P23 13	P24 1	P25 8
P31 3	P32 2	P33 15	P34 6	P35 12

Sumber: Diolah Penulis (2023)

Keterangan:

P01, P25, ... P35 = kelompok perlakuan

5, 4, 12 = satuan percobaan

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Dalam pelaksanaan penelitian ini, dua jenis data yang digunakan adalah data primer dan data sekunder. Penggunaan kedua jenis data ini memberikan dimensi yang lebih komprehensif dalam mengumpulkan informasi yang diperlukan untuk menjawab pertanyaan penelitian.

- Data primer merujuk pada informasi yang diperoleh secara langsung dari sumber aslinya untuk tujuan penelitian (Sugiyono, 2022). Dalam penelitian ini, data primer berupa hasil perhitungan usia tikus Wistar, pengukuran berat badan awal tikus Wistar, dan hasil pengukuran kadar MDA pada tikus Wistar yang diinhalasi asap rokok elektrik sebelum dan sesudah pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*).
- Data sekunder adalah informasi yang telah tersedia sebelumnya, telah dikumpulkan untuk tujuan lain dan digunakan kembali dalam penelitian (Sugiyono, 2022). Dalam penelitian ini, data sekunder mencakup literatur ilmiah sebelumnya tentang efek antioksidan terhadap kadar MDA atau

informasi tentang dampak paparan asap rokok elektrik pada tikus Wistar. Data sekunder dapat memberikan konteks yang lebih luas untuk hasil penelitian dan mendukung analisis yang lebih mendalam.

2. Teknik pengumpulan data

Dalam penelitian ini, data dikumpulkan melalui pemeriksaan laboratorium kadar MDA pada tikus Wistar menggunakan metode TBARS. Data yang terkumpul akan dianalisis dengan cermat.

3. Instrumen pengumpulan data

Dalam upaya untuk mengumpulkan data yang diperlukan dalam penelitian ini, berbagai instrumen pengumpul data akan digunakan sesuai dengan teknik pengumpulan data yang telah direncanakan. Instrumen ini akan membantu peneliti untuk mengukur kadar Malondialdehid (MDA).

- a. Alat tulis: berperan dalam mencatat data-data hasil pemeriksaan.
- b. Kamera: berperan dalam mendokumentasikan pelaksanaan penelitian.
- c. Spektrofotometri: berperan dalam mengukur kadar MDA pada tikus Wistar.

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan tikus Wistar: bak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, tempat makan, sonde, sekam, neraca analitik, *vape*, dan *smoking chamber*.
- b. Alat pengambilan sampel plasma: kapas, pipet mikrohematokrit untuk pengambilan sampel darah melalui *sinus orbitalis*, tabung EDTA, tabung *eppendorf*, *underpad*, dan *cool box*.

- c. Alat pembuatan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*): neraca analitik, blender, pisau, talenan, *erlenmeyer*, kertas saring, dan *aluminium foil*.
- d. Alat untuk pemeriksaan kadar MDA: pipet ukur, *bulb*, tabung reaksi, *waterbath*, *centrifuge*, mikropipet dan tip, baskom yang berisi air es, serta Spektrofotometer UV-Vis.
- e. Alat *hygiene* dan sanitasi: jas laboratorium, masker, *hand scoon*, *tissue*.

2. Bahan penelitian

- a. *Vape liquid* 6 mg.
- b. Bahan pemeliharaan tikus: pakan standar PUR 551 dan air isi ulang.
- c. Bahan pengambilan sampel plasma: *ketamine*, *xylazine*, dan *alcohol swab*.
- d. Bahan pembuatan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*): buah stroberi (*Fragaria x ananassa*) segar dan air mineral.
- e. Bahan pemeriksaan kadar MDA: plasma darah; reagen TBA 0,67%; reagen TCA 20%, tetrametoksipropan (TMP) murni 98%, dan aquadest.

3. Prosedur penelitian

- a. Pra-Analitik
 - 1) Persiapan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*)
 - a) Buah stroberi segar kemudian disortasi, dicuci, dan dibersihkan.
 - b) Prosedur penentuan dosis jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dilakukan menyesuaikan dengan prosedur yang dilakukan oleh Astuti (2020).
 - (1) Dosis 3 g/kg BB (P2)

Dosis yang diberikan kepada kelompok P2 adalah 3 g/kg BB sehari. Estimasi bobot tikus adalah 150-250 g, dengan rerata berat badan 168 g (0,168 kg). Setiap tikus diberikan volume per oral 3 mL.

Dosis pemberian tikus = dosis jus X BB tikus

$$= 3 \text{ g/kg BB} \times 0,168 \text{ kg}$$

$$= 0,504 \text{ g}$$

Dosis stok = $\frac{\text{dosis pemberian tikus}}{\text{volume pemberian}}$

$$= \frac{0,504 \text{ g}}{3 \text{ mL}}$$

$$= 0,168 \text{ g/mL}$$

Pada satu kelompok perlakuan P2, diperlukan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebanyak 15 mL dalam sehari.

Sediaan stok (25 mL) = dosis stok X volume stok

$$= 0,168 \text{ g/mL} \times 25 \text{ mL}$$

$$= 4,2 \text{ g}$$

Cara pembuatan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dengan dosis 3 g/kg BB tikus, yaitu:

Buah stroberi (*Fragaria x ananassa*) ditimbang sebanyak 4,2 g, lalu dihaluskan dan disaring menggunakan kertas saring pada *erlenmeyer* untuk mendapatkan sari jus. Tambahkan air mineral hingga volume mencapai 25 mL. Berikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebanyak 3 mL pada masing-masing tikus kelompok P2 secara oral menggunakan sonde.

(2) Dosis 6 g/kg BB (P3)

Dosis yang diberikan kepada kelompok P3 adalah 6 g/kg BB sehari. Estimasi bobot tikus adalah 150-250 g, dengan rerata berat badan 163,60 g (0,1636 kg). Setiap tikus diberikan volume per oral 3 mL.

Dosis pemberian tikus = dosis jus X BB tikus

$$= 6 \text{ g/kg BB} \times 0,1636 \text{ kg}$$

$$= 0,9816 \text{ g}$$

Dosis stok = $\frac{\text{dosis pemberian tikus}}{\text{volume pemberian}}$

$$= \frac{0,9816 \text{ g}}{3 \text{ mL}}$$

$$= 0,3272 \text{ g/mL}$$

Pada satu kelompok perlakuan P3, diperlukan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebanyak 15 mL dalam sehari.

Sediaan stok (25 mL) = dosis stok X volume stok

$$= 0,3272 \text{ g/mL} \times 25 \text{ mL}$$

$$= 8,18 \text{ g}$$

Cara pembuatan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dengan dosis 6 g/kg BB tikus, yaitu:

Buah stroberi (*Fragaria x ananassa*) ditimbang sebanyak 8,18 g, lalu dihaluskan dan di saring menggunakan kertas saring pada *erlenmeyer* untuk mendapatkan sari jus. Tambahkan air mineral hingga volume mencapai 25 mL. Berikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebanyak 3 mL pada masing-masing tikus kelompok P2 secara oral menggunakan sonde.

b. Analitik

1) Pemeliharaan tikus

Pemeliharaan tikus Wistar selama penelitian dilakukan berdasarkan prinsip etik hewan coba dan berdasarkan rekomendasi Feige-Diller *et al.*, (2019) dan ARRP (2022). Selama penelitian, tikus Wistar akan ditempatkan pada kandang yang

terbuat dari bak plastik dengan tutup anyaman kawat di lokasi *Bio Mice and Rat*. Tikus Wistar ditimbang berat badan pada awal percobaan menggunakan neraca analitik. Melakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Melakukan masa adaptasi/aklimatisasi selama tujuh hari dengan memberikan pakan dan minum standar. Selama penelitian pakan standar yang digunakan adalah PUR 551, diberikan satu kali sehari di pagi hari pukul 07.00 WITA secara *ad libitum*. Pakan standar PUR 551 mengandung kadar air maksimal 13%, protein 23%, lemak minimal 5%, serat maksimal 5%, abu 7%, kalsium minimal 0,9%, dan fosfor 0,6%.

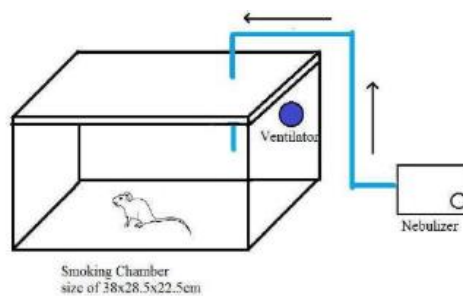
2) Perlakuan pada tikus percobaan

Tikus dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan metode *simple random sampling*, sebagai berikut.

- a) Kelompok P1 (kontrol negatif): diberikan pakan dan minum standar, serta inhalasi asap rokok elektrik 15 menit secara langsung pada *smoking chamber*, satu kali sehari selama 14 hari pada pukul 09.00 WITA menggunakan nikotin dengan kadar 6 mg/mL (hari ke-8 sampai hari ke-21).
- b) Kelompok P2 (kelompok eksperimen 1): diberikan pakan dan minum standar, serta inhalasi asap rokok elektrik 15 menit secara langsung pada *smoking chamber*, satu kali sehari selama 14 hari pukul 09.00 WITA menggunakan nikotin dengan kadar 6 mg/mL (hari ke-8 sampai hari ke-21). Dilanjutkan dengan memberikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) menggunakan sonde selama 14 hari dengan dosis 3 g/kg BB sebanyak 3 mL, satu kali sehari pada pagi hari pukul 09.00 WITA (hari ke-23 sampai hari ke-36).

- c) Kelompok P2 (kelompok eksperimen 1): diberikan pakan dan minum standar, serta inhalasi asap rokok elektrik 15 menit secara langsung pada *smoking chamber*, satu kali sehari selama 14 hari pukul 09.00 WITA menggunakan nikotin dengan kadar 6 mg/mL (hari ke-8 sampai hari ke-21). Dilanjutkan dengan memberikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) menggunakan sonde selama 14 hari dengan dosis 6 g/kg BB sebanyak 3 mL, satu kali sehari pada pagi hari pukul 09.00 WITA (hari ke-23 sampai hari ke-36).

Tikus Wistar dipindahkan dari kandang ke dalam *smoking chamber* untuk sementara selama proses inhalasi asap rokok elektrik. *Smoking chamber* terbuat dari bak plastik tertutup yang didesain sedemikian rupa.



Gambar 11. Ilustrasi *Smoking Chamber*
Sumber: En *et al.*, (2020)

- 3) Pengambilan sampel darah (Ochtavia dkk., 2017; Setyawati dan Hidayati 2021)

Pengambilan sampel darah *Pre-Test* dilaksanakan pada hari ke-22 sebelum diberikan jus stroberi (*Fragaria x ananassa*). Pengambilan darah untuk *Post-Test* dilaksanakan pada hari ke-37 setelah pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*). Sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus diberikan anestesi menggunakan *ketamine* dosis 40 mg/kg BB dan *xylazine* dosis 5 mg/kg BB.

Pengambilan sampel darah diambil melalui *sinus orbitalis* sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* EDTA menggunakan mikrohematokrit. Sampel yang akan digunakan untuk mengukur kadar MDA merupakan plasma darah. Darah yang telah dikumpulkan akan disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Plasma yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam *eppendorf* dan disimpan pada suhu 2±6°C hingga siap untuk dilakukan analisis. Pengiriman sampel plasma darah dari fasilitas *Bio Mice and Rat* menuju Laboratorium Kimia Terapan Poltekkes Denpasar dilakukan dengan menggunakan *cool box*. *Cool box*, sebuah wadah pendingin digunakan untuk menjaga kestabilan suhu sampel selama proses transportasi. Kestabilan suhu menjadi faktor kritis dalam menjaga viabilitas sel darah dalam sampel darah dan suhu yang optimal untuk transportasi plasma darah pada *cool box* diperkirakan pada rentang 1±10°C (Tim UTD RSUP Prof dr. I.G.N.G. Ngoerah, 2023).

4) Pemusnahan hewan coba (Siregar, 2017)

Prosedur pengorbanan tikus menggunakan *euthanasia* melalui injeksi intrakardiak dengan obat anestesi, yaitu *ketamine* dan *xylazine*, memerlukan pertimbangan etika dan kepatutan dalam perlakuan terhadap hewan percobaan. *Euthanasia* dipilih sebagai metode untuk mengakhiri hidup tikus dengan cara yang humanis dan efisien, menghindari penderitaan yang berkepanjangan. Dosis obat anestesi yang digunakan, yaitu *ketamine* 40 mg/kg BB dan *xylazine* 5 mg/kg BB. Setelah pengorbanan, tikus dianggap sebagai subjek penelitian yang telah memberikan kontribusi pada ilmu pengetahuan. Perlakuan *pasca-euthanasia* harus dilakukan dengan penuh rasa hormat dan kehati-hatian. Penanganan tubuh tikus yang telah dikorbankan melibatkan prosedur penyimpanan dan transportasi yang

memastikan kebersihan dan keamanan lingkungan, serta meminimalkan risiko kontaminasi atau paparan. Dilakukan insenerasi atau membakar sisa-sisa tikus setelah *euthanasia* dengan mematuhi regulasi dan etika pengelolaan limbah.

5) Pengukuran kadar MDA (Mulyani dkk., 2018; Soewoto dkk., 2016)

a) Pembuatan kurva standar TMP

Larutan stok tetrametoksipropen (TMP) dibuat dengan cara melarutkan 2 μ L larutan TMP murni dalam 160 mL aquadest. Larutan standar dibuat dalam lima konsentrasi yaitu: 0,65; 1,25; 2,5; 5,0; dan 10,0 nmol/mL, dengan cara larutan stok standar TMP dipipet 6,5 ; 12,5; 25; 50; dan 100 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan aquadest hingga 1000 μ L. Campuran larutan selanjutnya ditambahkan 1,5 mL larutan TBA 0,67%. Tabung diinkubasikan pada *waterbath* suhu 95-100°C selama 10 menit. Tabung reaksi kemudian dikeluarkan dari *waterbath* dan didinginkan dalam baskom yang berisi air es. Lakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 531 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dibuatkan kurva kalibrasi untuk analisis lebih lanjut.

b) Pengukuran kadar MDA sampel

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan mencampurkan 0,5 mL plasma darah dengan larutan 2,5 mL larutan trikloroasetat (TCA) 20% lalu dipanaskan pada *waterbath* selama 10 menit, setelah itu didinginkan dengan cepat menggunakan air es. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 1,5 ml kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi lain dan ditambahkan 1,5 mL larutan *thiobarbituric acid* (TBA) 0,67%. Larutan kemudian dipanaskan selama 10 menit pada suhu 95-100°C, lalu didinginkan dalam

baskom berisi air es, hasil filtrat diukur pada panjang gelombang 531 nm dengan Spektrofotometer secara duplo.

c. Post-Analitik

1) Kadar MDA

Dalam menghitung kadar Malondialdehid (MDA), setelah mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dalam bentuk $y = Ax + B$. Substitusikan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva kalibrasi (Soewoto dkk., 2016).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data dalam penelitian ini mencakup beberapa langkah penting. Pertama, dilakukan pencatatan usia dan berat badan awal setiap tikus untuk memastikan seluruh tikus berada dalam kriteria inklusi. Kedua, data MDA yang diperoleh dari pengukuran sebelum dan sesudah pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) pada tikus Wistar yang dikodekan dengan jelas untuk mengidentifikasi data *pre-test* dan *post-test* untuk setiap tikus. Analisis perbedaan antara kadar MDA pada waktu *pre-test* dan *post-test* dilakukan untuk setiap tikus. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel yang disertai dengan narasi.

Seluruh proses pengolahan data dilakukan dengan teliti. Hasilnya akan digunakan untuk mendukung kesimpulan dan jawaban terhadap pertanyaan penelitian mengenai efek potensial jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) dalam menurunkan kadar MDA tikus Wistar yang terpapar asap rokok elektrik.

2. Analisis data

Analisis perbandingan kadar MDA sebelum dan setelah pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) adalah langkah penting dalam penelitian ini untuk mengevaluasi apakah jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) memiliki efek yang signifikan dalam menurunkan kadar MDA pada tikus Wistar yang telah terpapar asap rokok elektrik. Penelitian ini menggunakan analisis bivariat melalui aplikasi SPSS untuk perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok eksperimen terkait kadar MDA. Berikut adalah langkah-langkah lebih rinci untuk melakukan analisis data:

a. Data *Pre-Test* dan *Post-Test*

Peneliti akan mengumpulkan data kadar MDA untuk setiap tikus Wistar dalam kelompok sebelum (*Pre-Test*) dan setelah (*Post-Test*) pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*).

b. Analisa Deskriptif

Analisa ini dilakukan untuk mendeskripsikan subjek penelitian.

c. Uji Normalitas dan Homogenitas

- 1) Uji Normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah n kurang dari 50 (Sugiyono, 2016). Uji *Shapiro-Wilk* merupakan komponen penting dalam penelitian ini karena berperan dalam memverifikasi apakah data kadar MDA yang diperoleh mengikuti distribusi normal atau tidak. Data dikatakan terdistribusi normal apabila nilai $p > 0,05$ (Siswanto dkk., 2016).
- 2) Uji Homogenitas menggunakan *Levene test*. Data dikatakan homogen apabila nilai $p > 0,05$.

- d. Uji Komparatif
- 1) Jika data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan uji *oneway ANOVA*, uji *Post Hoc*, dan *paired t-test*.
 - a) Uji *oneway ANOVA* digunakan untuk membandingkan antar kelompok perlakuan, baik pada hasil *Pre-Test* atau *Post-Test* guna mengidentifikasi apakah terdapat perbedaan yang signifikan di antara hasil *Pre-Test* atau *Post-Test*. Jika $p\text{-value} < 0,05$; maka dapat dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok *Pre-Test* dan *Post-Test*.
 - b) Uji *post hoc* digunakan sebagai lanjutan uji *ANOVA* untuk mengidentifikasi perbedaan yang lebih rinci antara kelompok-kelompok tertentu dengan membantu mengidentifikasi pasangan kelompok yang menunjukkan perbedaan yang signifikan. Jika $p\text{-value} < 0,05$; maka dapat dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan antara pasangan kelompok.
 - c) *Paired t-test* bertujuan untuk menguji keefektifan perlakuan pada rerata *Post-Test* dan *Pre-Test* masing-masing kelompok perlakuan. Jika $p\text{-value} < 0,05$, maka terdapat perbedaan signifikan antara rerata *Post-Test* dan *Pre-Test*, yang menunjukkan keefektifan jenis perlakuan.
 - 2) Jika $p\text{-value}$ lebih kecil dari α , maka dilakukan uji alternatif yang sesuai dengan data yang tidak terdistribusi normal atau uji non-parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Siswanto dkk., 2016).

e. Interpretasi Hasil

Setelah melakukan uji statistik, peneliti akan mendapatkan nilai *p-value* yang mengindikasikan apakah perbedaan antara kadar MDA sebelum dan setelah intervensi (jus stroberi) signifikan secara statistik. Data hasil pengukuran MDA menggunakan tingkat signifikansi 0,05 dan derajat kepercayaan 95%. Nilai *p-value* apabila kurang dari tingkat signifikansi yang telah ditentukan sebelumnya ($\alpha = 0,05$), maka H_a diterima atau dikatakan bahwa pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) memiliki efek potensial dalam menurunkan kadar Malondialdehid (MDA) tikus Wistar yang diinhalasi asap rokok elektrik.

H. Etika Penelitian

Etika penelitian hewan coba adalah seperangkat pedoman moral yang berlaku untuk seluruh tahapan kegiatan penelitian, termasuk peran peneliti dan subjek penelitian, sesuai dengan penjelasan Notoatmodjo (2018). Terdapat beberapa prinsip utama yang harus diikuti dalam etika penelitian yang dikutip melalui Sardjono (2019):

1. Tiga pilar prinsip etik penelitian
 - a. *Respect*: Menghormati hewan coba sebagai subjek penelitian.
 - b. *Beneficence*: Memastikan hasil penelitian bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain. Penelitian ini diharapkan dapat membantu dalam pengembangan obat-obatan ataupun terapi yang berbasis jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebagai upaya untuk meminimalisir dampak buruk dari stres oksidatif.

- c. *Justice*: Bersikap adil dalam memilih dan memperlakukan hewan coba. Pada penelitian ini, diterapkan teknik pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling*, agar seluruh populasi tikus mendapatkan kesempatan yang sama untuk menjadi subjek penelitian.
- 2. Prinsip etik penggunaan hewan coba
 - a. *Reduction*: Menggunakan jumlah hewan coba sekecil mungkin untuk hasil yang valid. Prinsip *reduction* diimplementasikan dengan membatasi jumlah tikus yang digunakan pada penelitian menjadi 15 ekor. Penelitian ini menargetkan jumlah tikus yang cukup untuk analisis statistik yang valid.
 - b. *Replacement*: Mencari alternatif penggunaan hewan percobaan atau dari orde yang lebih rendah (relatif). Penggunaan prinsip *replacement* dalam penelitian ini bertujuan untuk menggantikan penggunaan hewan rodensia lainnya, seperti kelinci, dengan tikus Wistar. Tikus Wistar dipilih karena memiliki karakteristik biologis yang serupa dengan hewan uji sebelumnya, memungkinkan hasil penelitian yang relevan tanpa mengorbankan jenis hewan yang mungkin lebih kompleks atau sensitif.
 - c. *Refinement*: Mengurangi penderitaan hewan coba dengan perawatan dan penanganan yang benar. Penelitian ini memastikan penggunaan obat anestesi untuk mengurangi rasa sakit pada hewan, menciptakan kondisi yang nyaman untuk menghindari stres berlebih, dan memastikan waktu penelitian yang cukup singkat. Tenaga ahli terlatih bertanggung jawab atas penanganan tikus dalam memberikan perawatan yang baik dan mengurangi ketidaknyamanan hewan.

3. Prinsip etik pemeliharaan hewan coba (ARRP, 2022).
 - a. *Freedom of hunger and thirst*: Hewan coba harus diberikan makanan dan minuman sesuai dengan jenisnya untuk memenuhi kebutuhan gizi. Prosedur ini dirancang untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan hidrasi tikus, memastikan kebebasan dari kelaparan dan kekurangan air yang dapat memengaruhi kesejahteraan hewan, dimana pada penelitian ini, tikus akan diberikan pakan secara *ad libitum*, dengan pakan PUR 551 dan air isi ulang.
 - b. *Freedom from pain, injury, and diseases*: Dilakukan upaya untuk mencegah penyakit dan memberikan perawatan medis jika diperlukan. Prinsip ini ditekankan melalui penanganan hati-hati oleh tenaga terlatih, pemberian jus stroberi (*Fragaria x ananassa*) secara oral untuk mencegah rasa sakit pada tikus, dan penggunaan anestesi sebelum pengambilan sampel darah. Semua langkah ini diambil dengan tujuan memastikan kebebasan dari rasa sakit yang dapat mengganggu kesejahteraan tikus.
 - c. *Freedom from discomfort*: Kandang hewan coba harus dirancang dengan baik untuk menciptakan lingkungan yang nyaman, termasuk suhu, kelembaban, pencahayaan, dan ventilasi yang sesuai. Setiap kelompok tikus ditempatkan pada kandang berbeda dengan ukuran yang memadai (120 x 70 cm).
 - d. *Freedom from fear and distress*: Pengenalan hewan coba (adaptasi) ke lingkungan kandang yang nyaman dan memberikan stimulasi mental. Adaptasi selama 7 hari memungkinkan tikus untuk beradaptasi dengan lingkungan, teman sejenis, dan tenaga terlatih.

- e. *Express natural behavior*: Hewan coba memiliki kesempatan untuk mengungkapkan perilaku alami, seperti mencari makanan dan kontak sosial. Luas kandang yang digunakan ($\pm 120 \times 70$ cm) dirancang untuk memungkinkan tikus mengekspresikan perilaku alami dan berinteraksi dengan teman sejenis.

Prinsip-prinsip etika tersebut harus diterapkan dengan cermat untuk memastikan bahwa penelitian dilakukan dengan integritas tinggi dan tanggung jawab moral terhadap hewan percobaan, serta hasil penelitian yang dihasilkan dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat.