

BAB 3 METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental, *postest only control group design*. Postes untuk menganalisis perubahan jumlah *purkinje* pada lapisan ganglionar serebelum otak tikus pada berbagai kelompok perlakuan.

B. Subyek Penelitian

Sampel penelitian ini adalah anak tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*, anak tikus yang diperlukan sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing 5 ekor. Empat (4) kelompok diinduksi hipotiroid dengan diberi *propylthiourasil* (PTU), 2 kelompok lainnya normal. Anak-anak tikus yang lahir dikelompokkan berdasarkan perlakuan sebagai berikut:

- KI : Normal tanpa perlakuan
- KII : Normal + ikan kembung
- KIII : Hipotiroid tanpa pengobatan
- KIV : Hipotiroid + ikan kembung
- KV : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin
- KVI : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin + ikan kembung

Randomisasi dilakukan pada induk dan anak-anak dalam satu induk, hal tersebut karena anak-anak tikus tetap menyusu selama kurang lebih 20 hari.

Masing-masing kelompok perlakuan menggunakan 5 ekor anak tikus. Angka tersebut diperoleh dari perhitungan jumlah sampel menurut Federer (1963).

Rumus Federer = $(n-1)(t-1) \geq 15$

Dimana n : besar sampel setiap kelompok

t : jumlah kelompok

jadi, menurut Federer, banyaknya sampel yang diperlukan adalah:

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/5$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel yang akan digunakan harus lebih dari atau sama dengan 4 hewan uji setiap kelompok. Pada penelitian ini akan menggunakan 5 sampel setiap kelompok. hal ini bertujuan untuk memudahkan penulis dalam perhitungan analisis data. Oleh karena itu, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini totalnya 30 ekor tikus *Sprague dawley*.

C. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di UPHP UMY untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan induk dan pengobatan hormon pengganti tiroksin. Pemberian perlakuan anak tikus berupa pemberian suplemen daging ikan kembung yang di kukus kemudian di sangrai yang di lakukan di Lab. Biomedik FKIK UMY. Pembuatan preparat histologi dilakukan di bagian patologi anatomi Fakultas Kedokteran UGM. Pengambilan gambar preparat dilakukan di Laboratorium Hostologi Fakultas Kedokteran UMY.

Penelitian ini merupakan penelitian Program Kreativitas Mahasiswa. Penelitian ini di mulai pada 28 Februari 2015 dan telah diselesaikan pada Juni 2016.

D. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini antara lain:

1. Variabel bebas yaitu kelompok tikus berdasarkan pemberian perlakuan, yaitu induksi hipotiroid kongenital, terapi hormon tiroid pengganti, dan terapi ikan kembang
2. Variabel tergantung adalah jumlah rata-rata jumlah sel *purkinje* perlapang pandang pada lapisan ganglionare serebelum.
3. Variabel terkendali yaitu kondisi pakan dan kandang sama pada setiap kelompok

E. Definisi Operasional

1. Pemberian *prophylthiourasil* (PTU): pemberian PTU pada induk tikus adalah suatu bentuk perlakuan, dimana perlakuan ini akan menyebabkan tikus menjadi hipotiroid. PTU sendiri adalah obat anti tiroid yang digunakan sebagai obat untuk menghambat produksi hormon tiroid.
2. Suplemen daging ikan kembang adalah bentuk perlakuan terhadap hewan uji yaitu dengan memberikan daging ikan kembang yang telah di olah sebagai suplemen yang berguna sebagai makanan tambahan bagi subjek penelitian yang kemudian akan diamati efeknya terhadap jumlah sel *purkinje* di serebelum.
3. Terapi tiroksin diberikan dengan dosis 1,8 mg/200 g BB/ hari. Pada penelitian ini rata-rata berat awal tikus saat diterapi ialah 50 g, sehingga

dosis tiroksin yang diberikan ialah 0,45-0,5 mg/hari, pemberian dosis akan disesuaikan dengan berat badan tikus. Tiroksin dilarutkan dalam aquades (sesuai jumlah air yang dikonsumsi tikus per hari) (Zhong, 2008).

4. Rerata Jumlah sel *purkinje* adalah rerata jumlah sel structural dan fungsional jaringan saraf pada serebelum yang dibuat sediaan histologi dengan pewarnaan HE. Penelitian dilakukan terhadap banyaknya sel *purkinje* serebelum pada lapisan ganglionare korteks serebelum.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Tikus putih *Sprague Dawley* 12 ekor,
2. kandang tikus,
3. pakan tikus,
4. ikan kembung,
5. *Propylthiourasil* (PTU),
6. tiroksin,
7. botol air mineral bekas beserta tutup dan selangnya,
8. air secukupnya,
9. obat bius (kloroform),
10. toples,
11. peralatan bedah tikus,
12. pot untuk menyimpan jaringan,
13. alkohol yang telah diencerkan,
14. gelas preparat,
15. mikroskop dan kamera,

16. alat hitung,
17. komputer.

G. Prosedur Penelitian

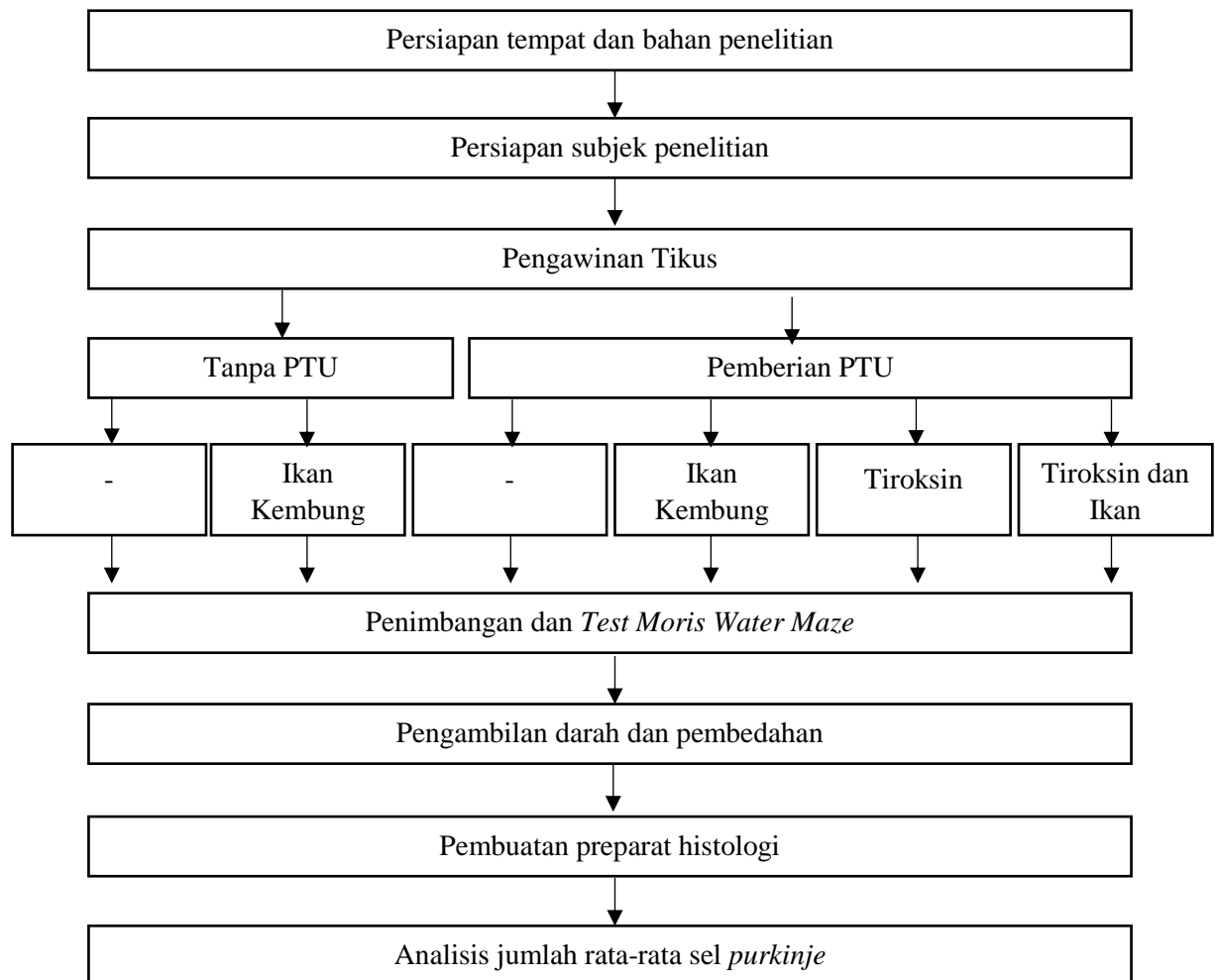
1. Pengadaan tikus Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan masing masing 5 ekor tiap kelompok.
2. Tikus diadaptasikan selama 3-6 hari.
3. Tikus dikawinkan dengan pejantan dan deteksi kebuntingan dengan *swab vagina*. Jika terdapat sel sperma tikus, maka dicatat sebagai hari pertama kebuntingan.
4. Tikus putih diinduksi PTU 0,015 %. Cara induksi PTU : induksi PTU dimulai dari kebuntingan hari ke 5 sampai post natal ke 15 dengan dosis sebagai berikut: dosis 15 ppm yang dicampur dengan air matang. Dan dibagi sesuai dengan kebutuhan air minum induk tikus perhari.
5. Ukur kadar FT4 serum pada saat usia anak tikus 3 minggu dengan metode Elisa.
6. Tikus putih diberi tiroksin. Cara pemberian tiroksin : pemberian tiroksin pada induk tikus mulai dari hari ke 21 post natal sampai 2 bulan dengan dosis sebagai berikut: dosis 1,8 mg/200 g BB/ hari. Pada penelitian ini rata-rata berat awal tikus saat diterapi ialah 50 g, sehingga dosis tiroksin yang diberikan ialah 0,45-0,5 mg/hari, Pemberian dosis akan disesuaikan dengan berat badan tikus. Tiroksin dilarutkan dalam aquades (sesuai jumlah air yang dikonsumsi tikus per hari) (Zhong, 2008).

7. Tikus diberi ikan kembung. Cara pemberian suplemen ikan kembung: Pemberian ikan kembung pada anak tikus mulai dari penyapihan sampai akhir penelitian. Suplemen ikan diberikan 20% dari pakan (Khomsan A, 2004). proses pengolahan ikan kembung sebagai makanan tikus adalah sebagai berikut
 - a. Ikan kembung dikukus
 - b. Dilepaskan dagingnya dari tulang
 - c. Disangrai supaya kering
 - d. Dicampur dan diletakkan di bagian atas pakan tikus dengan prosentase 20% dari pakan tikus.
 - e. Diberikan mulai dari hari 21 sampai akhir penelitian atau minggu ke 8.
8. Pembedahan tikus dilaksanakan pada akhir penelitian. Pembedahan diawali dengan euthanasia menggunakan anastesi kloroform hingga tikus mati. Kemudian diambil organ otaknya menggunakan pinset dan gunting bedah. Otak diletakkan di dalam pot yang telah diisi menggunakan formalin 10% sebelum dikirimkan ke Laboratorium Patologi Anatomi UGM.
9. Organ otak tikus dibuat preparat histologi. Untuk pembuatan preparat histopatologi dibutuhkan bahan utama berupa jaringan otak, yang difiksasi dalam larutan formalin (BNF) 10%. Jaringan dipotong dan diatur dalam tissue cassetes, didehidrasi secara otomatis dengan mesin dehidrasi, dikeringkan dengan mesin vaccum, clan diblok dengan cairan parafin, selanjutnya blok tersebut dipotong 3 - 5 μ m dengan mesin mikrotom dan

potongan tersebut dilekatkan pada kaca obyek. Setelah itu kaca obyek diwarnai secara manual dengan hematoksin eosin. Pewarnaan tersebut akan memberikan keseimbangan warna biru dan merah dengan jelas pada jaringan, sehingga komponen sel dapat diidentifikasi dengan jelas (Muntiha, 2001).

10. Sediaan histologi kemudian diamati dan dipotret menggunakan mikroskop dan software mikroskop digital kamera dengan lensa okuler 10 dan obyektif 4 sehingga didapatkan perbesaran total 40x pada lapang pandang $52 \times 39 = 2067$ mikrometer. Penilaian dilakukan terhadap jumlah sel *purkinje* yang dapat dihitung pada lapisan ganglionare korteks serebelum hewan uji dengan satuan sel per lapang pandang. Data berskala numerik.
11. Analisis data hasil yang ada di jadikan nilai rata – rata. Dari nilai rata-rata dianalisis apakah ada perbedaan hasil pada tiap kelompok, yang akan membuktikan bahwa suplemen ikan kembung dapat memperbaiki jumlah sel *purkinje* pada serebelum.

H. Jalannya Penelitian



Gambar 11. Jalannya Penelitian

I. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan jumlah sel per lapang pandang merupakan data berskala numerik. Data diuji normalitasnya dengan metode deskriptif dan metode analitik uji shapiro-Wilk karena jumlah sampel 30 dengan nilai signifikansi 0,704 yang artinya distribusi data hasil penelitian normal. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan (>2 kelompok) dan bukan merupakan variabel yang berpasangan (independent) maka untuk menguji hipotesis perbedaan pada semua kelompok perlakuan dengan persebaran data normal

digunakan analisis statistik *One Way Anova*. Kemudian, untuk mengetahui perbandingan pengaruh masing-masing terapi pada setiap kelompok terhadap kelompok yang lain. Digunakan uji post hoc test multiple comparison. Data analisa didapatkan dari pengamatan gambaran histologi sel *purkinje* serebelum otak pada tikus hewan uji.

J. Etika Penelitian Penelitian

Karya Tulis Ilmiah ini telah mendapatkan persetujuan ethical clearance dari Komisi Etik Penelitian FKIK UMY tentang penggunaan hewan uji sebagai subjek penelitian, dengan nomor : 173/EP-FKIK-UMY/V/2016.