

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental, *posttest only control group design*. Posttest untuk menganalisis perubahan jumlah sel piramid pada korteks serebrum otak tikus pada berbagai kelompok perlakuan.

B. Populasi Dan Sample

Subjek penelitian ini adalah anak tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*. Sampel yang digunakan memiliki kriteria inklusi sebagai berikut:

1. Anak-anak tikus dengan induk yang diinduksi PTU mulai dari kebuntingan hari ke 5 hingga laktasi hari ke 15.
2. Tidak menderita penyakit dan belum pernah mendapat perlakuan.

Anak-anak tikus yang lahir dikelompokkan berdasarkan perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok I adalah tikus normal tanpa perlakuan.
- b. Kelompok II adalah tikus normal yang terapi ikan kembung.
- c. Kelompok III adalah tikus hipotiroid tanpa perlakuan.
- d. Kelompok IV adalah tikus hipotiroid yang diterapi ikan kembung.

- e. Kelompok V adalah tikus hipotiroid yang diterapi tiroksin.
- f. Kelompok VI adalah tikus hipotiroid yang diterapi tiroksin dan ikan kembung.

Randomisasi dilakukan pada induk dan anak-anak dalam satu induk, hal tersebut karena anak-anak tikus tetap menyusu selama kurang lebih 21 hari.

Masing-masing kelompok perlakuan menggunakan 5 ekor anak tikus. Angka tersebut diperoleh dari perhitungan jumlah sampel menurut Federer (1963 dalam Ridwan (2013)).

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

Keterangan: n: besar sampel setiap kelompok

T: jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan:

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

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

$$(n-1) \geq \frac{15}{5}$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Jumlah sampel yang digunakan harus lebih besar atau sama dengan 4 ekor hewan uji tiap kelompok. Pada penelitian ini akan menggunakan 5 ekor hewan uji pada masing-masing kelompok. Hal ini dilakukan untuk memudahkan penulis dalam perhitungan analisis data. Sehingga jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor tikus *Sprague Dawley*.

C. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di UPHP UMY untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada induk, pengobatan hormon pengganti tiroksi dan pemberian terapi berupa ikan kembung. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM. Pengambilan gambar preparat dilakukan di Laboratorium histologi Fakultas Kedokteran UMY.

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

D. Variabel Penelitian

Variable dalam penelitian ini antara lain:

1. Variable bebas: Perlakuan yang diberikan, yaitu induksi hipotiroid kongenital, terapi hormon tiroid pengganti dan terapi ikan kembung.
2. Variable tergantung: Jumlah sel piramid korteks serebrum pada tikus hipotiroid kongenital.

E. Definisi Oprasional

1. Hipotiroid Kongenital

Adalah anak-anak tikus yang lahir dari induk yang induksi propil tiourasil (PTU) 15 ppm selama kebuntingan mulai gestasi hari ke-5

sampai postnatal hari ke 15. Dan dibagi sesuai dengan kebutuhan air minum induk tikus perhari.

2. Suplemen Ikan Kembung

Pemberian ikan kembung: pada anak tikus mulai dari penyapihan sampai akhir penelitian. Suplemen ikan diberikan 20% dari pakan. Proses pengolahan ikan kembung sebagai makanan tikus

1. Ikan kembung dikukus
2. Dilepaskan dagingnya dari tulang
3. Disangrai supaya kering
4. Dicampur dan diletakkan di bagian atas pakan tikus dengan prosentase 20% dari pakan tikus.
5. Diberikan mulai dari hari 21 sampai akhir penelitian atau 2 bulan.

3. Terapi tiroksin

Pemberian tiroksin pada induk tikus mulai dari hari ke-21 postnatal sampai 2 bulan dengan dosis 1,8 mg/200g BB/hari. Pada penelitian ini rata-rata berat awal tikus saat diterapi adalah 50g, sehingga dosis tiroksin yang diberikan adalah 0,45-0,5 mg/hari. Tiroksin dilarutkan dalam akuades pada volume air minum perhari.

4. Sel Piramid Korteks *Serebrum*

Sel piramid korteks serebrum adalah sel neuron berbentuk piramid yang dapat diamati pada preparat dengan perbesaran 40x (luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$). Untuk setiap preparat dilakukan pengulangan pada

5 satuan lapang pandang. Data yang didapat berskala numerik. Sel piramid ini banyak terdapat pada bagian lapisan korteks serebrum, yaitu antara *lamina molekularis* sampai *lamina multiformis*.

F. Instrumen Penelitian

Dalam penelitian ini alat dan bahan yang digunakan adalah 30 ekor anak tikus putih *Sprague Dawley*, kandang tikus, pakan tikus, ikan kembung, Propiltiourasil (PTU), tiroksin, botol air mineral bekas beserta tutup dan selangnya, air secukupnya, obat bius (*kloroform*), toples, peralatan bedah tikus, pot untuk menyimpan jaringan, formalin yang telah diencerkan, gelas preparat, mikroskop dan kamera, alat hitung, aplikasi TopView untuk menghitung jumlah sel.

G. Cara Pengumpulan Data

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

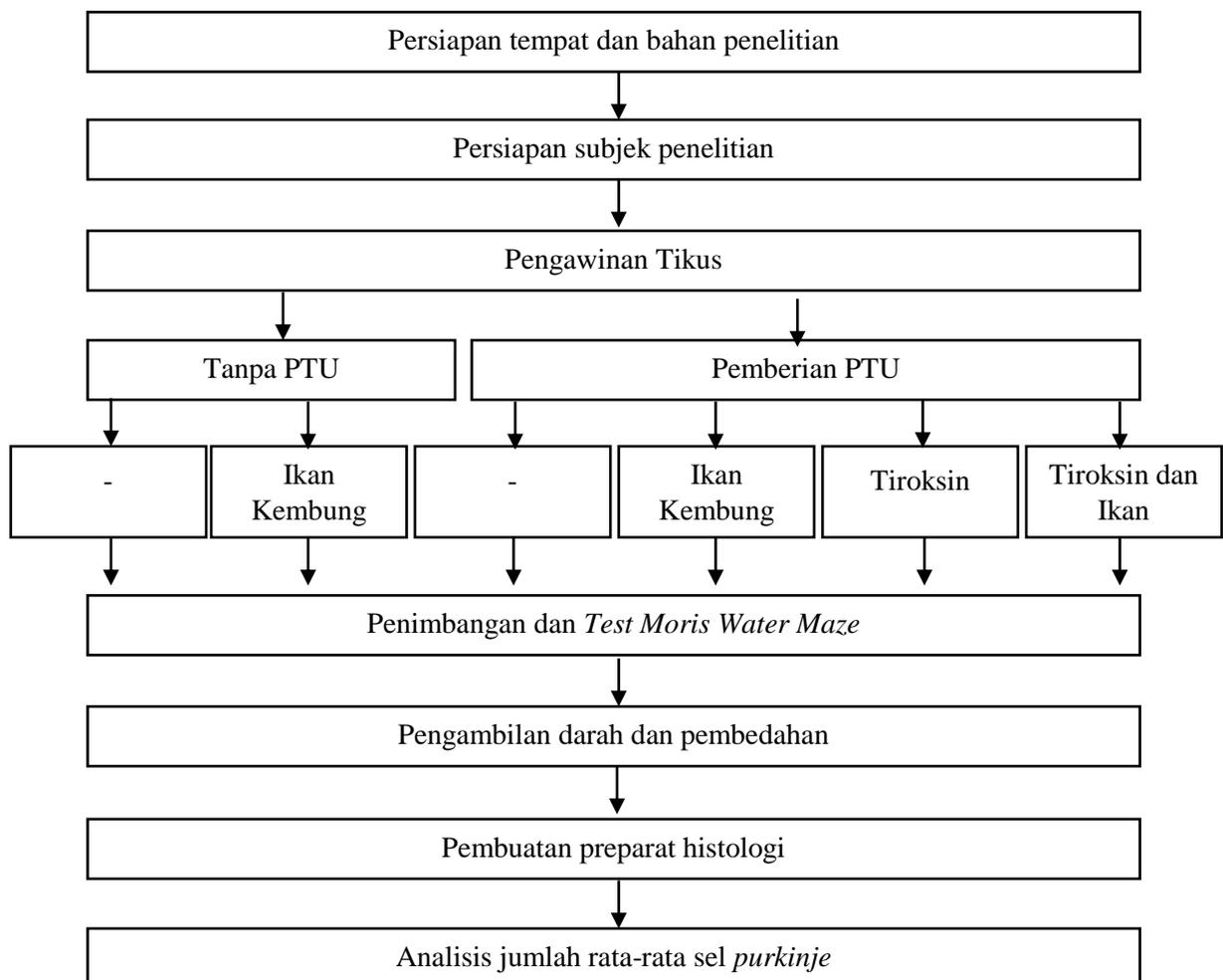
sebagai berikut: dosis 15 ppm yang dicampur dengan air matang dalam volume air minum perhari.

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 10 ml aquades (sesuai jumlah air yang dikonsumsi tikus per hari) (Zhong, 2008).
7. Tikus diberi ikan kembung. Cara pembuatan 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 Ikan kembung dikukus
 1. Dilepaskan dagingnya dari tulang
 2. Disangrai supaya kering
 3. Dicampur dan diletakkan di bagian atas pakan tikus dengan prosentase 20% dari pakan tikus.
 4. 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. Pembuatan preparat diawali dengan pengiriman jaringan otak ke bagian TU Patologi Anatomi UGM. 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*, dan diblok dengan cairan parafin, selanjutnya blok tersebut dipotong 3 - 5 μm dengan mesin mikrotom dan potongan tersebut dilekatkan pada kaca obyek. Setelah itu kaca obyek diwarnai secara manual dengan *hematoksilin 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 dan lakukan pengulangan pada 5 lapang pandang. Penilaian dilakukan terhadap jumlah sel *pyramid* yang dapat

dihitung pada *lamina molecularis lamina* hingga *multiformis cortex cerebri* 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 piramid korteks serebrum.



Gambar 9. Bagan cara pengumpulan data

H. Analisa Data

Data yang diperoleh merupakan hasil pengamatan jumlah sel perlima lapang pandang sehingga data berskala numerik. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan (>2 kelompok) posttes antar kelompok yang berbeda sehingga untuk menguji hipotesis perbedaan pada semua kelompok perlakuan digunakan analisis statistik *One Way Anova*. Sebelumnya dilakukan uji normalitas dengan menggunakan metode deskriptif dan metode analitik uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel 30. Kemudian untuk mengetahui perbandingan pengaruh masing-masing terapi pada setiap kelompok terhadap kelompok yang yang lain, digunakan uji *Post Hoc Test Multiple Comparison*. Data analisa didapatkan dari pengamatan preparat histologi otak pada tikus hewan uji.

I. Etika 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