

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Model penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test controlled group design* terhadap hewan uji.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah 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 hari kebuntingan ke 5 hingga laktasi hari ke 21
2. Sehat dan belum pernah mendapat perlakuan

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 30 ekor yang di acak dan di bagi menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 5 ekor sampel. Anak-anak tikus yang lahir tersebut dikelompokkan sebagai berikut:

1. Normal (Kontrol)
2. Normal diberi suplemen ikan kembang
3. Hipotiroid tanpa diberi suplemen ikan kembang dan tanpa terapi tiroksin

4. Hipotiroid diberi suplemen ikan kembung
5. Hipotiroid diberi terapi tiroksin
6. Hipotiroid diberi suplemen ikan kembung dan terapi tiroksin

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) pada rentang waktu \pm 5 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Suplemen Ikan Kembung dan Tiroksin
2. Variabel terikat : Memori spasial pada tikus
3. Variabel terkontrol : kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok

E. Definisi Operasional

1. Suplemen ikan kembung

Suplemen ikan kembung adalah Suplemen yang mengandung ikan kembung. Pemberian suplemen ikan kembung pada tikus putih yaitu dengan dosis 20% dari pakan. Sebelumnya ikan dikukus hingga matang, dipotong-potong kecil kemudian disangrai sehingga bentuknya menyerupai abon ikan.

2. Memori Spasial pada tikus

Memori Spasial pada tikus ialah kemampuan daya ingat tikus untuk dapat mengenali ruangan, arah serta navigasi setelah diletakkan pada suatu tempat. Memori spasial tikus diukur dengan *Morris Water Maze* (Lihat Gambar 1). Dengan menggunakan alat ini, tikus diharapkan dapat menemukan *platform* (titik awal) pada suatu kolam besar berbentuk lingkaran.

3. Tikus Hipotiroid Kongenital diinduksi Propiltiourasil (PTU)

Tikus hipotiroid kongenital diinduksi PTU adalah anak tikus yang lahir dari induk hipotiroid diinduksi PTU dengan dosis 0,025% mulai dari hari kehamilan ke 5 sampai laktasi hari ke 15. Kemudian tikus di saph pada usia 3 minggu.

F. Alat Dan Bahan Penelitian

1. Bahan :

- a. PTU
- b. Aquades
- c. Tiroksin
- d. Ikan Kembung

2. Alat :

- a. *Moris water maze*
- b. Timbangan digital
- c. Stop watch
- d. Meteran

G. Jalannya Penelitian

1. Pengadaan tikus. Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan masing-masing 5 ekor tiap kelompok. Masing-masing kelompok akan diberi perlakuan sebagai berikut :
 1. Normal (Kontrol)
 2. Normal diberi suplemen ikan kembung
 3. Hipotiroid tanpa diberi suplemen ikan kembung dan tiroksin
 4. Hipotiroid diberi suplemen ikan kembung
 5. Hipotiroid diberi terapi tiroksin
 6. Hipotiroid diberi suplemen ikan kembung dan tiroksin
2. Tikus diadaptasikan selama 7 hari.
3. Tikus dikawinkan dengan pejantan.
4. Tikus putih diinduksi PTU 0,025 % mulai kehamilan hari ke 5 hingga laktasi hari ke 15 .
5. Ukur kadar T4 darah induk bunting dan sebagian anak saat usia 2 bulan setelah penginduksian dengan metode *Elisa*.
6. Pemberian perlakuan sesuai kelompok masing-masing yaitu pemberian suplemen ikan kembung dan terapi tiroksin. Perlakuan diberikan setiap hari selama 5 minggu pada tikus mulai usia tiga minggu hingga usia delapan minggu. Pemberian suplemen ikan kembung dibuat dengan cara ikan dikukus terlebih dahulu kemudian daging yang telah matang

dipotong-potong dengan ukuran kecil. Potongan daging ikan kembung di keringkan dan kemudian daging ikan disangrai agar tekstur dan komposisi daging ikan kembung dapat bertahan untuk waktu yang cukup lama. Pemberian suplemen ikan kembung dengan dosis 20% dari pakan.

Terapi tiroksin diberikan dengan dosis 1,8 mg/200 gram BB/ hari. Pada penelitian ini rata-rata berat awal tikus saat diterapi ialah 50 gram, 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).

7. Pengukuran kemampuan belajar memori spasial menggunakan alat *Morris Water Maze* dengan acuan metode Vorhees dan William (2006) selama 3 hari berturut-turut. Sebelum dilakukan pengujian memori spasial selama 3 hari, tikus akan dilatih terlebih dahulu selama 1 hari dengan frekuensi latihan 1 kali pada alat *Morris Water Maze*. Latihan ini dinamakan waktu laten pembelajaran. Alat pengujian berupa kolam besar berbentuk lingkaran dan berdiameter 1,5 meter dengan tinggi 60 cm. Kolam diisi dengan air hingga ketinggian 30 cm. Air dalam kolam diberi bedak putih untuk menyamarkan platform agar tidak terlihat oleh tikus. Pengujian memori spasial pada tikus dengan menggunakan alat *Morris Water Maze* ialah dengan cara tikus diletakkan pada platform (titik awal). Ciri-ciri platform yang digunakan pada pengujian ini ialah tidak dapat dikenali oleh tikus dengan visual dan sama dengan warna air pada alat.

Platform diletakkan pada salah satu kuadran. Tikus menempati platform selama satu menit untuk memberi kesempatan tikus mengenali ruangan yang baru ditempati. Setelah itu tikus dilepas dari platform menuju kuadran tertentu menghadap dinding kolam. Kuadran pada alat ini dibagi menjadi 4. Tikus harus dapat menemukan platform setelah dilepaskan pada masing-masing kuadran dengan waktu ≤ 60 detik. Jika tikus dapat menemukan platform > 60 detik, maka pengujian memori spasial pada kuadran yang diujikan dianggap gagal. Waktu yang telah diperoleh dari pengujian dicatat sebagai hasil dari uji memori spasial pada tikus dalam penelitian ini.

H. Analisis Data

Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 16.0. Data yang telah terkumpul akan dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel, jika distribusi normal selanjutnya dianalisis statistik menggunakan uji *One Way ANOVA*, jika distribusi data tidak normal menggunakan *Kruskal-Wallis Test* kemudian dilakukan *Mann Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan nilai antar kelompok. Pada penelitian ini distribusi data tidak normal sehingga digunakan uji non parametrik.

I. Kesulitan Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa kendala diantaranya kesulitan dalam pengkondisian ruangan untuk subjek penelitian dikarenakan cuaca yang tidak menentu sehingga banyak hewan uji yang mati. Untuk itu pada penelitian mendatang perlu pengkondisian ruang yang lebih baik. Selain itu terdapat kendala dalam pemberian suplemen ikan kembung tiap tikus. Pada penelitian ini tikus tiap kelompok tidak dipisahkan satu persatu sehingga kemungkinan pemberian suplemen tidak merata tiap tikus. Untuk itu pada penelitian mendatang tiap hewan uji lebih baik dipisahkan dalam masing-masing ruang. Selain itu, pada tahap uji *Moris Water Maze*, air pada kolam sebaiknya diberi susu untuk mewarnai air menjadi putih bukan bedak putih karena ditakutkan ada efek yngg buruk pada hewan coba. Inilah kesulitan-kesulitan dalam penelitian yang peneliti alami, semoga bisa menjadi bahan perbaikan untuk penelitian di masa yang akan datang.