

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Model penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test and controlled group design* terhadap hewan uji. Posttest untuk menganalisis perubahan dan perbedaan kadar FT4 serum tikus hipotiroid kongenital.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley*. Sampel yang digunakan memiliki kriteria inklusinya yaitu anak-anak tikus dengan induk yang diinduksi PTU mulai dari hari kebuntingan ke-15 hingga laktasi hari ke-21, induk tikus usia 4-5 bulan, tikus dipelihara dengan pemberian makanan pokok berupa pakan AD2 dan minum *ad libitum*, pencahayaan diberikan 12 jam terang dan 12 jam gelap dan temperatur diatur dengan sirkulasi udara berupa kipas angin dengan rentang suhu 25⁰ C-30⁰ C. Tikus akan dieksklusi jika mengalami sakit selama penelitian.

Jumlah sampel penelitian ini adalah 30 ekor secara acak dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor sampel.

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

1. Kelompok 1 yaitu anak-anak tikus yang lahir normal

2. Kelompok 2 yaitu anak-anak tikus yang lahir normal yang diberi suplemen ikan kembung
3. Kelompok 3 yaitu anak-anak tikus yang hipotiroid kongenital
4. Kelompok 4 yaitu anak-anak tikus hipotiroid kongenital yang diberi suplemen ikan kembung
5. Kelompok 5 yaitu anak-anak tikus hipotiroid kongenital yang diberi terapi tiroksin
6. Kelompok 6 yaitu anak-anak tikus hipotiroid kongenital yang diberi suplemen ikan kembung dan terapi tiroksin

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

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

Dimana n : besar sampel setiap kelompok

t : jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan :

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

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

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

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

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

C. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) pada rentang waktu Oktober 2014 sampai dengan Juli 2015.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Suplemen Ikan kembung dan terapi tiroksin
2. Variabel terikat : Kadar FT4 serum pada tikus yang diukur dengan metode Elisa
3. Variabel terkendali : Kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok

E. Definisi Operasional

1. Tikus Hipotiroid Kongenital diinduksi PTU

Tikus hipotiroid kongenital diinduksi PTU adalah anak tikus yang lahir dari induk hipotiroid diinduksi PTU dengan dosis 0,015% selama 3 minggu mulai dari hari kehamilan ke-15 sampai laktasi hari ke-21. Kemudian tikus di sapih pada usia 3 minggu.

2. Suplemen ikan kembung dibuat dengan cara:

Pemberian suplemen ikan kembung, yaitu memberi ikan kembung dengan takaran 20% dari pakan. Sebelumnya ikan dikukus hingga matang supaya tidak menghilangkan zat yang dibutuhkan kemudian dipotong kecil-kecil dan disangrai. Suplemen ikan kembung diletakkan diatas pakan tikus, diberi perlakuan tersebut mulai usia dua minggu hingga delapan minggu (Khomsan A, 2004).

3. Terapi tiroksin

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 10 ml aquades (sesuai jumlah air yang dikonsumsi tikus per hari) (Zhong, 2008).

4. Kadar FT4 serum

Kadar FT4 serum adalah konsentrasi hormon tiroksin bebas dalam serum. Pengukuran kadar FT4 serum dengan metode Elisa untuk mengetahui kondisi tikus yang hipotiroid. Nilai normal FT4 adalah 0,8 – 2,0 ng/dl.

F. Alat dan Bahan

1. Bahan :

- a. PTU
- b. Aquades
- c. Tiroksin

d. Ikan Kembung

2. Alat

a. Timbangan digital

b. Kandang

c. Kipas

d. Lampu

G. Alur Jalannya Penelitian

1. Pengadaan tikus : Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan masing masing 5 ekor tiap kelompok.
2. Tikus diadaptasikan selama 6 hari.
3. Tikus dikawinkan dengan pejantan dan deteksi kebuntingan dengan *swab vagina*.
4. Tikus putih diinduksi PTU 0,015 % mulai kehamilan hari ke-5 hingga laktasi hari ke-15.
5. Ukur kadar FT4 serum kelompok normal sebanyak 2 tikus dan kelompok hipotiroid sebanyak 5 tikus pada saat usia anak tikus 3 minggu dengan metode Elisa, untuk mengetahui hasil pemberian PTU.
6. Pemberian perlakuan sesuai kelompok masing-masing.

Tikus mendapatkan perlakuan sesuai kelompoknya masing-masing dimulai usia 4 minggu sampai usia 8 minggu (Gillberg, 2005). 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 (Khomsan A, 2004).

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 10 ml aquades (sesuai jumlah air yang dikonsumsi tikus per hari) (Zhong, 2008).

7. Ukur kadar FT4 serum setelah perlakuan pada saat usia 8 minggu dengan metode Elisa. Pengukuran FT4 dengan metode Elisa dilakukan di Laboratorium BP.GAKY Magelang. Teknik Elisa dijabarkan sebagai berikut : menentukan jumlah microtiter yang akan digunakan kemudian meletakkan pada penahannya, masukkan masing-masing 25 μ L sebagai larutan standar, kontrol dan serum tikus, masukkan 200 μ L enzim *conjugate* ke dalam setiap sumuran dan diaduk selama 10 detik, inkubasi selama 60 menit dalam suhu ruangan, mengeluarkan seluruh isi sumuran dan dicuci 3 kali menggunakan larutan pencuci sebanyak 400 μ L setiap sumuran, menghentakkan sumuran dengan keras di atas kertas penyerap untuk menghilangkan gumpalan residu, menambahkan 200 μ L substrat solution pada setiap sumuran, inkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan dan menghentikan reaksi enzimatik dengan

menuangkan 100 μ L stop solution pada setiap sumuran, kemudian membaca penyerapan pada setiap sumuran menggunakan *microtiter plate reader* 10 menit setelah penambahan *stop solution* (Lequin, 2005).

8. 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 meningkatkan kadar FT4 serum.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan merupakan data berskala numerik. Karena dalam penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan (>2 kelompok) bukan merupakan variabel yang berpasangan (independent) dan distribusi data tidak normal, maka untuk menguji hipotesis perbedaan pada semua kelompok perlakuan digunakan analisis statistik *Kruskal Wallis*. Data diuji 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 lain, digunakan uji *Mann Whitney*. Data analisa didapatkan dari pengukuran kadar FT4 serum.

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 : 239/EP-FKIK-UMY/V/2016.