

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

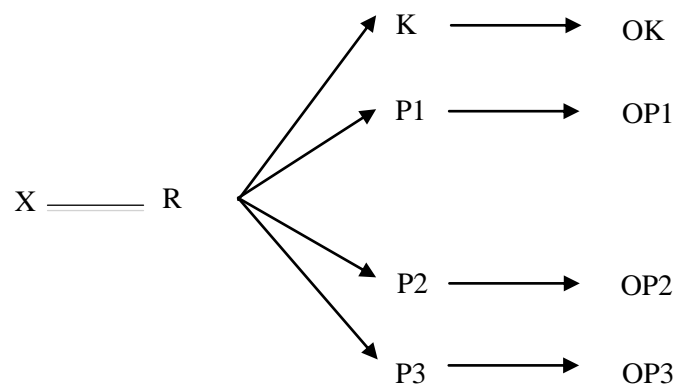
Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Farmakologi dan Kardiologi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi FK UNDIP dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni dan rancangan yang dipakai adalah *Post Test Only Control Group Design* yaitu dengan cara membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol sebagai *baseline* dan kelompok perlakuan yang diberi tindakan pada hari ke 3, 7, 21.



Gambar 6. Rancangan penelitian

Keterangan :

X__R : Masa adaptasi

R : Randomisasi

K : Kontrol

Kelompok mencit yang diberi air minum *ad libitum*

P1 : Perlakuan 1

Kelompok mencit yang diberi *STZ* dan pada hari ke-3 dilakukan terminasi

P2 : Perlakuan 2

Kelompok mencit yang diberi *STZ* dan pada hari ke-7 dilakukan terminasi

P3 : Perlakuan 3

Kelompok mencit yang diberi *STZ* dan pada hari ke-21 dilakukan terminasi

OK : Pengamatan pada kelompok Kontrol

OP1 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 1

OP2 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 2

OP3 : Pengamatan pada kelompok Perlakuan 3

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

4.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit Swiss yang dikembangkan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang

4.4.2 Sampel

4.4.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah mencit Swiss jantan, umur 3 bulan, berat badan 25 – 35 gram, kondisi sehat, dan tidak tampak kelainan anatomis maupun fisiologis.

4.4.2.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah mencit Swiss mati sebelum tiba waktu observasi dan mencit tidak menderita DM setelah injeksi *STZ*.

4.4.3 Cara Sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*) untuk menghindari bias. Dengan cara ini semua objek atau elemen populasi memiliki kesempatan yang sama sebagai sampel.

4.4.4 Besar Sampel

Besar sampel berdasarkan kriteria WHO untuk penelitian adalah lima ekor per-kelompok perlakuan.⁵¹ Pada penelitian ini terdapat empat kelompok perlakuan. Pada setiap kelompok digunakan lima ekor mencit, dan 10% mencit tambahan sebagai cadangan pada masing-masing kelompok kecuali pada kelompok kontrol. Masing-masing kelompok dimasukkan dalam satu kandang dengan diberi makan standart dan minum *ad libithum*.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas adalah lama sakit mencit.

4.5.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah perkembangan fibrosis miokard.

4.6 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Mencit dengan diabetes melitus yang diinduksi dengan <i>STZ</i>	Mencit Swiss jantan berusia 3 bulan dengan berat 25-30 g yang pada hari ke 3 setelah injeksi intraperitoneal Streptozotocin dengan dosis 180 mg/kg bb dalam larutan sitrat buffer pH 4.5 memiliki glukosa darah puasa ≥ 17 mmol/L atau 306 mg/dL	mg	Nominal
Fibrosis miokard	Fibrosis miokard diamati dari jaringan miokard mencit yang tercatat biru dengan pengecatan Masson's Trichrome. Tingkat fibrosis diukur dari rasio antara area miokardium yang mengalami fibrosis dibanding seluruh area miokardium		Rasio

Tabel 2. Definisi Operasional

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

1. *STZ*
2. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 4.5
3. Pakan dan minum standar mencit
4. Buffer formalin 4%
5. Masson's Trichrome kit

4.7.2 Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan
3. Sonde lambung
4. Pipet ukur
5. Tabung reaksi
6. Batang pengaduk
7. Spatula
8. Inkubator
9. Alat test glukosa darah (Accu-Chek)

4.7.3 Jenis Data

Pemeriksaan fibrosis miokard setelah pemberian *STZ* merupakan data primer

4.7.4 Cara Kerja

1) Perlakuan terhadap hewan coba

1. 26 ekor mencit stain Swiss berumur tiga bulan diadaptasikan selama tujuh hari di laboratorium di dalam kandang dan diberi pakan standar dan minum *ad libitum*.
2. Setelah diadaptasikan, mencit-mencit tersebut dibagi menjadi lima kelompok secara acak dan dikandangkan per-kelompok.
3. Kelompok Kontrol (K) : lima mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *STZ* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan

pakan standar dan minum. Kemudian dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Dan dilakukan terminasi dan pengambilan sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan Masson's Trichrome. Mencit kelompok ini digunakan sebagai *baseline*.

4. Kelompok P1 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *STZ* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-3 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah puasa, dan diterminasi untuk pengambilan sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
5. Kelompok P2 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *STZ* dalam PBS pH 4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-7 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah puasa, dan diterminasi untuk pengambilan sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.
6. Kelompok P3 : tujuh mencit ditimbang berat badan, diukur glukosa darah melalui vena ekor, dan diinjeksikan dengan *STZ* dalam PBS pH

4.5 secara intraperitoneal pada hari ke-0. Pada hari ke-3 dilakukan pemeriksaan glukosa darah melalui vena ekor. Mencit mendapatkan pakan standar dan minum. Pada hari ke-21 dilakukan *simple random sampling* untuk menentukan 5 sampel yang ditimbang berat badan, diukur glukosa darah puasa, dan diterminasi untuk pengambilan sampel miokard. Setelah itu dilakukan pengecatan dengan Masson's Trichrome.

2) Pengambilan sampel miokard⁵²

1. Mencit Swiss diterminasi dengan dislokasi cervix, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%.
2. Abdomen mencit diiris pada tempat dimana processus xiphoideus dari sternum ditemukan.
3. Diafragma mencit dipotong.
4. Thoraks dibuka dengan mengiris bagian kanan dari sternum, kemudian dipindahkan ke kiri dan difiksasi dengan klem.
5. Organ jantung dengan cepat dikeluarkan dan dibersihkan dengan larutan fisiologis.
6. Organ jantung yang sudah dibersihkan lalu direndam di larutan buffer formalin untuk dibuat *slide*.
7. Organ jantung dipotong secara parallel dengan cincin atrioventricular sehingga memiliki ketebalan 2 mm

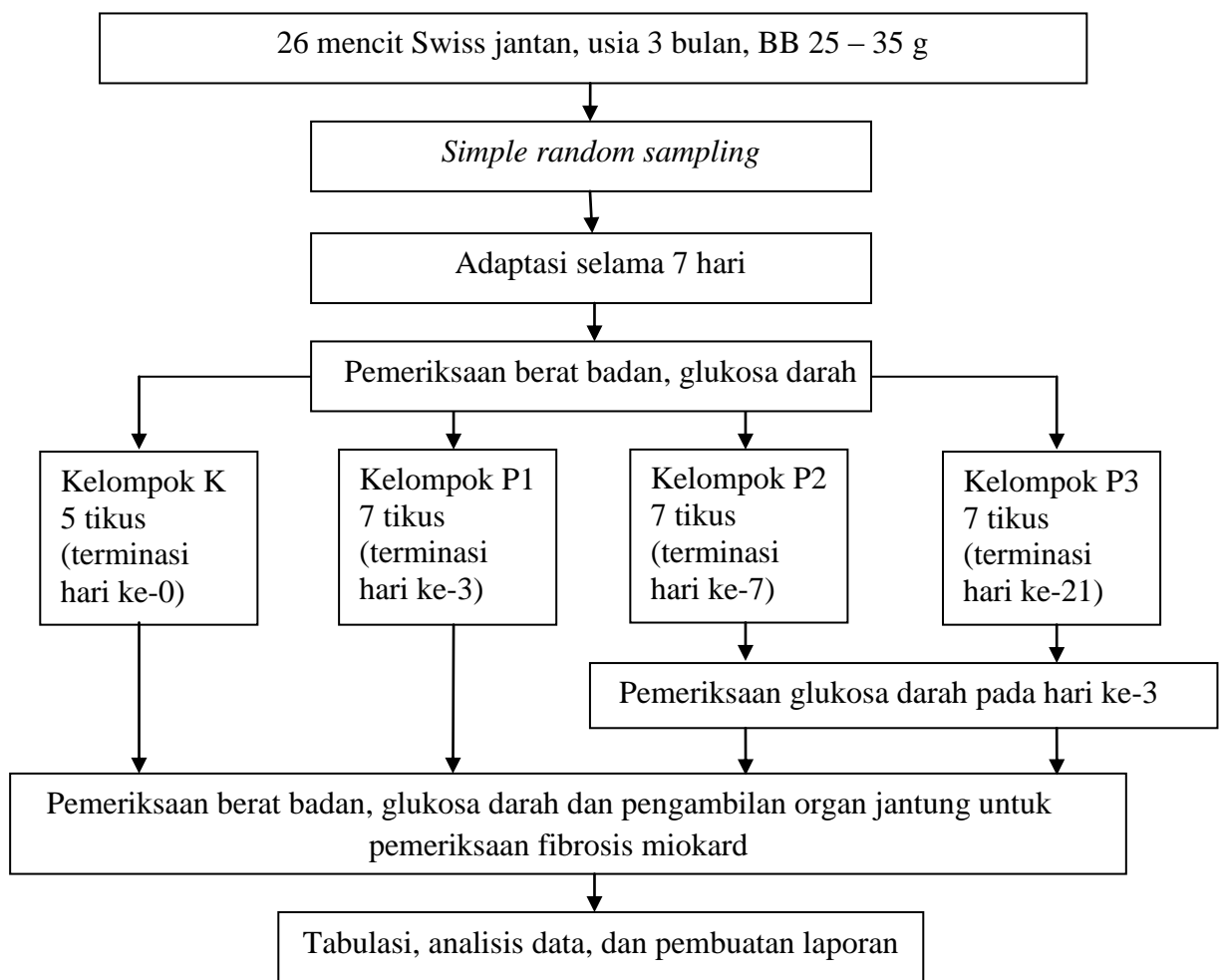
8. Potongan organ jantung tersebut diblok parafin dan dipotong lebih lanjut sehingga menjadi slides yang memiliki ketebalan 4 μm dan kemudian dicat dengan *hematoxylin-eosin (HE)*

3) Pengecatan Masson's Trichrome⁵³

1. Slide di-deparafinasi dan rehidrasi dengan 100% alkohol, 95% alkohol, 70 % alkohol
2. Slide dicuci dengan Aquades
3. Untuk jaringan yang difiksasi dengan formalin, refiksasi dengan larutan Bouin's selama 1 jam pada suhu 56°C untuk meningkatkan kualitas pengecatan walaupun langkah ini tidak harus dilakukan.
4. Slide direndam dengan air mengalir selama 5 – 10 menit untuk menghilangkan warna kuning
5. Slide dicat dengan larutan kerja *Weigert's iron hematoxylin* selama 10 menit
6. Slide direndam dengan air mengalir yang hangat selama 10 menit
7. Slide dicuci dengan Aquades
8. Slide dicat dengan larutan *Biebrich scarlet-acid fuchsin* selama 10 – 15 menit
9. Slide dicuci dengan Aquades
10. Slide didiferensiasi dengan larutan *phosphomolybdic-phosphotungstic acid* selama 10 – 15 menit atau sampai warna kolagen tidak merah

11. Slide langsung dicat (tanpa direndam) dengan larutan Anilin Blue selama 5 – 10 menit. Slide direndam sesaat di Aquades dan didifferensiasi dengan larutan asam asetat 1% selama 2 – 5 menit.
12. Slide dicuci dengan Aquades
13. Slide di-dehidarasi dengan cepat menggunakan etil alkohol 95%, etil alkohol absolut (langkah ini akan menghilangkan cat *Biebrich scarlet-acid fuchsin*) dan slide dibersihkan dengan *xylene*
14. Slide ditaruh di atas medium yang memiliki resin

4.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram alur penelitian

4.9 Pengolahan dan Analisis Data

4.9.1 Pengolahan Data

4.9.1.1 Cleaning

Pada data penelitian dilakukan pembersihan data. Data diteliti dahulu agar tidak terdapat data yang tidak diperlukan.

4.9.1.2 Editing

Editing dilakukan untuk meneliti kelengkapan data, kesinambungan data, dan keseragaman data sehingga validitas data terjamin.

4.9.1.3 Coding

Coding dilakukan untuk memudahkan dalam pengolahan data termasuk pemberian skor.

4.9.1.4 Entying

Entying data adalah memasukan data dalam komputer untuk dilakukan proses analisa data.

4.9.2 Analisis Data

Setelah data di-edit, di-coding, dan di-entry, data dianalisis statistik dan deskriptif. Analisis statistik dalam penelitian ini menggunakan program SPSS 16.00 for Windows. Dalam analisis deskriptif dihitung kecenderungan sentral dan sebaran, dan hasilnya disajikan dalam diagram box-plot sesuai dengan kelompok perlakuan. Setelah itu dinilai normalitas dari variabel dengan uji *Saphiro-Wilk*.

Jika distribusi data dinilai normal maka dilakukan uji hipotesis dengan uji *One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA)*, kemudian dilanjutkan uji LSD untuk analisa *Post Hoc*. Apabila distribusi data dinilai tidak normal maka uji hipotesis dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Batas nilai yang dianggap signifikan dalam penelitian adalah jika $p < 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%.

4.10 Etika Penelitian

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang/RSUP Dr. Kariadi pada tanggal 6 Mei 2013.

4.11 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Januari				Februari				Maret				April				Mei			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi literature																				
Penyusunan proposal																				
Seminar proposal																				
Persiapan peminjaman laboratorium																				
Persiapan alat dan bahan																				
Penelitian																				
Analisis data																				
Penulisan laporan																				
Seminar hasil																				

Tabel 3. Jadwal penelitian