

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Ruang Lingkup**

Penelitian termasuk dalam lingkup disiplin farmakologi dan kardiologi.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di dua tempat yaitu Laboratorium Biologi FMIPA UNNES Semarang untuk pemberian intervensi pada hewan coba serta pembedahan dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang untuk pemeriksaan histopatologi miokardium dari hewan coba. Waktu yang dibutuhkan untuk menyelesaikan seluruh prosedur penelitian adalah 2 bulan.

#### **4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian berjenis eksperimental murni dengan rancangan penelitian berupa *randomized post-test only control group design* untuk analisis komparatif luas fibrosis interstisial miokardium dan *cohort* untuk analisis kesintasan.

#### **4.4 Sampel**

##### **4.4.1 Kriteria Inklusi**

Hewan coba yang termasuk dalam penelitian berupa mencit betina galur Swiss berusia 8 minggu dengan berat badan 25-30 gram yang didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM).

#### 4.4.2 Kriteria Eksklusi

Mencit dieksklusi ketika ditemukan mati selama proses adaptasi di lokasi penelitian. Kematian subjek dilihat dari tidak adanya detak jantung dan gerakan dada untuk bernapas. Kematian yang terjadi saat periode induksi infark miokardium, yaitu sejak injeksi isoproterenol pertama hingga 24 jam pasca-injeksi terakhir termasuk kriteria eksklusi. Hewan coba yang mati dalam periode induksi ini (2 hari) diperiksa jaringan miokardiumnya secara histopatologis.

#### 4.4.3 Kriteria Dropout

Kriteria *dropout* berupa hewan coba yang mati dalam rentang waktu pemberian metformin yaitu sejak penyondean pertama hingga 24 jam pasca-penyondean terakhir. Hewan coba yang mati dalam periode ini diambil jantungnya untuk dinilai secara histopatologi. Kesintasan dengan keluaran berupa hidup-mati hewan coba selama periode tersebut (28 hari atau 4 minggu) dinilai dengan analisis kesintasan.

#### 4.4.4 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dihitung menggunakan *resource equation method* dengan rumus sebagai berikut:

$$E = \text{Jumlah total hewan coba} - \text{jumlah kelompok}$$

dengan E berarti derajat kebebasan *analysis of variance* (Anova). Nilai E sebaiknya berada pada kisaran 10 dan 20. Jika E di bawah 10, penambahan hewan coba akan memberi hasil yang lebih signifikan. Sebaliknya, jika E lebih dari 20 maka penambahan hewan coba tidak akan meningkatkan kemungkinan signifikansi hasil penelitian.<sup>30</sup>

Apabila terdapat 4 kelompok penelitian, berdasarkan rumus tersebut perhitungan besar sampel adalah :

$$E = 14 - 4$$

$E = 10$  (nilai E berada pada kisaran 10 dan 20 sehingga dapat diterima).

Jumlah hewan coba sebanyak 14 ekor dan terdapat 4 kelompok penelitian, sehingga pada masing-masing kelompok terdapat 4 ekor hewan coba. Untuk mengantisipasi kemungkinan terjadinya *dropout*, dilakukan koreksi besar sampel dengan rumus:

$$n' = \frac{n}{1-f}$$

Keterangan :

$n'$  = besar sampel terkoreksi

$n$  = besar sampel minimum

$f$  = perkiraan proporsi *dropout*

Diperkirakan proporsi *dropout* mencapai 63%, sehingga didapatkan jumlah sampel di tiap kelompok sebesar 11 ekor mencit. Total hewan coba yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah sebesar 44 ekor mencit.

## 4.5 Variabel Penelitian

### 4.5.1 Variabel Bebas

Metformin

### 4.5.2 Variabel Terikat

Luas fibrosis interstisial miokardium dan kesintasan.

## 4.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi operasional

No.	Variabel	Unit	Skala
1.	<b>Metformin</b> Pemberian metformin dengan dosis 300 mg/kg/hari secara per oral menggunakan sonde yang dilarutkan dalam 0,1 ml aquadest.	ya/tidak	Nominal
2.	<b>Luas fibrosis interstisial miokardium</b> Luas fibrosis interstisial adalah luas daerah berwarna biru dengan pengecatan Masson's Trichrome yang diambil dari miokardium mencit. Sediaan histopatologi tersebut akan dianalisis menggunakan perangkat lunak komputer ImageJ (National Institute of Health, Amerika Serikat).	$\mu\text{m}^2$	Numerik
3.	<b>Kesintasan</b> Ketahanan hidup hewan coba selama 28 hari penelitian berlangsung terhitung sejak dilakukannya penyondean pertama hingga 24 jam pasca-penyondean terakhir.	status: ▪ mati ▪ hidup	Nominal

## 4.7 Cara Pengumpulan Data

### 4.7.1 Bahan

- 1) (-)-Isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich, Singapura)
- 2) Metformin tablet
- 3) Aquadest (Aqua destilata)
- 4) Aqua bidestilata steril *pro injectionem*
- 5) *Buffered neutral formalin* (BNF) 10%
- 6) Ethanol 70%
- 7) *Phosphate buffer saline* (PBS)
- 8) Kloroform
- 9) Masson's Trichrome *stain kit*
- 10) Pakan standar mencit (hi-pro-vite)

- 11) Sekam kayu

#### **4.7.2 Alat**

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Sonde lambung
- 3) Alat makan dan minum hewan coba
- 4) Timbangan *digital*
- 5) Micrometer sekrup *digital*
- 6) Alat suntik (*sprit*) 25 gauge
- 7) Peralatan bedah evakuasi jantung
- 8) Peralatan pembuatan preparat histopatologi
- 9) Mikroskop binokuler (Olympus CX21, Jepang)
- 10) Kamera mikroskop digital (Optilab Advance, Indonesia)
- 11) Komputer

#### **4.7.3 Jenis Data**

Data yang didapatkan adalah data primer.

#### **4.7.4 Cara Kerja**

##### **4.7.4.1 Pemilihan Subjek**

Subjek penelitian yaitu mencit galur Swiss didapatkan dari LPPT UGM dan telah disesuaikan dengan kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

##### **4.7.4.2 Perlakuan**

Subjek penelitian dibawa ke Laboratorium Biologi FMIPA UNNES dengan kendaraan mobil yang dilengkapi *air conditioner* dan diposisikan agar keamanan dan kenyamanan hewan coba terjamin, seperti mencegah paparan lingkungan

yang ekstrem, menghindari *overcrowding*, menyediakan kebutuhan fisik, fisiologis, dan perilaku hewan coba, serta melindungi dari trauma fisik.<sup>31</sup>

Empat puluh empat ekor hewan coba diadaptasi selama tujuh hari dengan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum*. Hewan coba kemudian dialokasikan secara random ke dalam empat kelompok penelitian. Sistem pengandangan dan pemeliharaan hewan coba merujuk pada *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.<sup>28</sup>

#### **Kelompok Kontrol (K)**

Sebelas ekor mencit dimasukkan ke dalam kelompok kontrol. Pada hari ke-1 dan ke-2, mencit diberi injeksi subkutan di daerah tungkai belakang berupa 0,1 ml **aqua bidestilata steril** dengan selang waktu pemberian 24 jam. Pada hari ke-3 sampai hari ke-30, hewan coba diberi **aquadest** 0,1 ml secara per oral dengan sonde lambung. Volume 0,1 ml dipilih berdasarkan kapasitas lambung mencit.<sup>32</sup> Interval waktu antar penyondean 24 jam. Pakan standar dan air minum hewan coba selama penelitian tetap diberikan *ad libitum*.

#### **Kelompok Metformin (MET)**

Sebelas ekor mencit dimasukkan ke dalam kelompok MET. Pada hari ke-1 dan ke-2, mencit diberi injeksi subkutan di daerah tungkai belakang berupa 0,1 ml **aqua bidestilata steril** dengan selang waktu pemberian 24 jam. Pada hari ke-3 sampai hari ke-30, hewan coba diberi **metformin** 300 mg/kg/hari yang dilarutkan dalam 0,1 ml aquadest secara per oral dengan sonde lambung. Dosis metformin ditentukan atas dasar karakteristik farmakokinetika metformin<sup>33,34</sup> dan dosis pada

penelitian sebelumnya.<sup>12</sup> Interval waktu antar penyondean 24 jam. Pakan standar dan air minum hewan coba selama penelitian tetap diberikan *ad libitum*.

#### **Kelompok Isoproterenol (ISO)**

Sebelas ekor mencit dimasukkan ke dalam kelompok ISO. Pada hari ke-1 dan ke-2, mencit diberi injeksi subkutan di daerah tungkai belakang berupa **(-)-isoproterenol hydrochloride** 10 mg/kg/hari<sup>35</sup> yang dilarutkan dalam 0,1 ml aqua bidestilata steril dengan selang waktu pemberian 24 jam. Pada hari ke-3 sampai hari ke-30, hewan coba diberi **aquadest** 0,1 ml secara per oral dengan sonde lambung. Interval waktu antar penyondean 24 jam. Pakan standar dan air minum hewan coba selama penelitian tetap diberikan *ad libitum*.

#### **Kelompok Isoproterenol dan Metformin (ISO+MET)**

Sebelas ekor mencit dimasukkan ke dalam kelompok ISO+MET. Pada hari ke-1 dan ke-2, mencit diberi injeksi subkutan di daerah tungkai belakang berupa **(-)-isoproterenol hydrochloride** 10 mg/kg/hari<sup>35</sup> yang dilarutkan dalam 0,1 ml aqua bidestilata steril dengan selang waktu pemberian 24 jam. Pada hari ke-3 sampai hari ke-30, hewan coba diberi **metformin** 300 mg/kg/hari yang dilarutkan dalam 0,1 ml aquadest secara per oral dengan sonde lambung. Interval waktu antar penyondean 24 jam. Pakan standar dan air minum hewan coba selama penelitian tetap diberikan *ad libitum*.

Dilakukan pengukuran berat badan mencit setiap satu minggu. Penyondean pada seluruh subjek dilakukan secara tersamar (*blinded*) oleh teknisi ahli laboratorium. Subjek penelitian kemudian diterminasi menggunakan metode

pembiusan dengan inhalasi kloroform yang selanjutnya dilakukan dekapitasi.<sup>36</sup>

Dilakukan pengukuran panjang tibia dan berat jantung kemudian.

#### **4.7.4.3 Pembedahan**

Pembedahan dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Mencit diposisikan terlentang
- 2) Dilakukan insisi pada kulit dan dinding abdomen untuk membuka rongga peritoneum.
- 3) Diafragma dan tulang iga dipotong pada kedua sisi rangka dada. Selanjutnya, rangka dada diangkat.
- 4) Jantung dipisahkan dari selaput perikardium.
- 5) Pembuluh-pembuluh darah besar dipotong pada titik masuk/keluar dari jantung. Dilakukan eksisi pada jantung.
- 6) Jantung ditekan perlahan untuk mengeluarkan darah yang tersisa. Cairan yang masih tertinggal di dalam jantung dibersihkan dengan handuk.
- 7) Dilakukan pengukuran berat jantung.<sup>37</sup>

#### **4.7.4.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Miokardium**

Prosedur pembuatan preparat histopatologi miokardium yang dikerjakan oleh tenaga ahli Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi dimulai setelah pengambilan organ jantung dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- 1) Organ jantung dipotong secara melintang pada ventrikel kiri setinggi apeks, pertengahan, dan basal. Jantung direndam di dalam 10 ml larutan BNF 10% untuk difiksasi selama dua hari pada suhu ruang. Selanjutnya,



jantung diblok menggunakan parafin, dipotong 3-5  $\mu\text{m}$  dan potongan tersebut dilekatkan pada kaca obyektif<sup>38</sup>

- 2) Blok kemudian dicat dengan *hematoxylin and eosin (H&E)*.<sup>38</sup>
- 3) Sampel jantung dideparafinasi dan direhidrasi jaringan menggunakan PBS.<sup>39</sup>
- 4) Sampel diberi larutan mordan berupa *Bouin's solution* dengan suhu 60°C selama satu jam.
- 5) Sampel direndam selama 5 menit menggunakan air mengalir untuk menghilangkan warna kuning akibat adanya asam pikrat.
- 6) Sampel dicat dengan *Weigert's working hematoxylin* selama 10 menit, direndam dalam air mengalir selama 5 menit, dan dicuci menggunakan aquadest.
- 7) Sampel dicat dengan *Biebrich scarlet* selama 5 menit kemudian dicuci menggunakan aquadest.
- 8) Sampel dicat dengan *Phosphotungstic/phosphomolybdic acid* selama 10 menit, dibuang larutannya, dan dilanjutkan dengan pengecatan *Aniline blue* selama 5 menit.
- 9) Sampel dicuci dengan aquadest dan dideferensiasi dengan asam asetat 1% selama satu menit, dibuang, dan dicuci kembali menggunakan aquadest.
- 10) Slide didehidrasi, dibersihkan, dan ditutup dengan kaca penutup.<sup>40</sup>

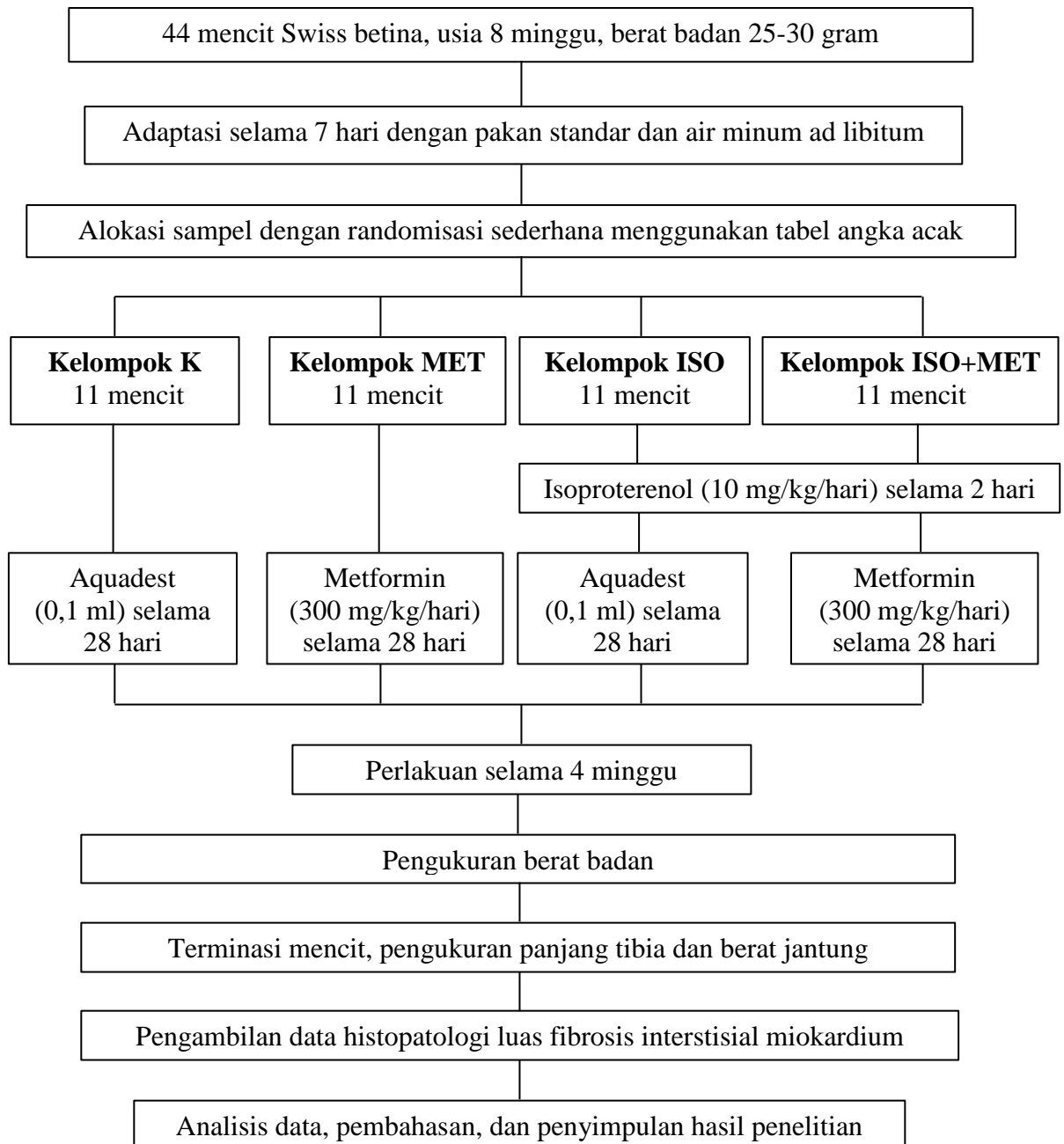
#### **4.7.4.5 Pengukuran Luas Fibrosis Interstisial Miokardium**

Pengukuran dilakukan pada preparat jantung yang telah dicat *Masson's Trichrome*. Gambar diperoleh menggunakan mikroskop binokuler (pembesaran

40x) yang dilengkapi kamera digital dan *image processor*.<sup>16</sup> Pencahayaan, pembesaran, dan fokus mikroskop serta lapangan pandang dipilih agar menghasilkan gambar yang optimal.<sup>41</sup> Diambil lima lapangan pandang pada potongan apeks sampai basis dan dihitung area berwarna biru, khususnya yang terlokalisasi pada perivaskular, pembuluh darah intramural, dan jaringan miokardium.<sup>13</sup>

Selanjutnya, luas jaringan fibrosis dihitung dan dianalisis menggunakan perangkat lunak komputer yaitu ImageJ oleh seorang ahli secara tersamar (*blinded*). Dengan perangkat lunak ini, area yang berwarna biru dan daerah yang tidak tercatat dibedakan menggunakan ambang warna tertentu dan dihitung luasnya.<sup>42</sup>

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 8. Alur penelitian

## 4.9 Analisis Data

### 4.9.1 Analisis Komparatif

Data disajikan terlebih dahulu secara deskriptif untuk mengetahui karakteristiknya. Ukuran pemusatan dan penyebaran data dipilih sesuai distribusi data yang secara analitis diuji dengan uji normalitas Saphiro-Wilk. Jika data mempunyai distribusi data normal, dipilih rerata sebagai ukuran pemusatan dan standar deviasi (SD) sebagai ukuran penyebaran. Namun, jika data tidak normal, dipilih median sebagai ukuran pemusatan dan minimum-maksimum sebagai ukuran penyebaran. Data deskriptif disajikan dalam bentuk tabel dan histogram.<sup>43,44</sup>

Uji hipotesis dipilih berdasarkan pemenuhan syarat untuk uji parametrik. Varians data diuji dengan uji varians Levene. Jika semua syarat uji parametrik terpenuhi, data dianalisis dengan uji *one way* Anova. Apabila tidak memenuhi syarat, diupayakan untuk transformasi data agar distribusi menjadi normal dan/atau varians menjadi sama. Jika pada uji *one way* Anova didapatkan nilai  $p < 0,05$  maka dilanjutkan dengan analisis *post-hoc* (uji LSD jika memenuhi syarat parametrik).<sup>44</sup>

Data analitik pada tiap variabel yang dibandingkan disajikan dalam bentuk tabel yang mencakup jumlah subjek tiap kelompok, rerata atau median tiap kelompok, standar deviasi atau minimum-maksimum tiap kelompok, perbedaan rerata antar kelompok dan standar deviasinya (jika distribusi data normal), nilai  $p$ , serta interval kepercayaan (IK). Batas derajat kemaknaan ditetapkan  $p < 0,05$

dengan IK 95%. Penyajian data deskriptif dan analitik serta analisis data diolah dengan program komputer.<sup>45</sup>

#### **4.9.2 Analisis Kesintasan**

Analisis kesintasan dilakukan dengan metode Kaplan-Meier. Perbedaan kesintasan antar kelompok dianalisis menggunakan *lloh-rank (Mantel-Cox) test*. Data ditampilkan dalam bentuk kurva Kaplan-Meier dengan nilai p. Batas derajat kemaknaan ditetapkan  $p < 0,05$ . Penyajian dan analisis data diolah menggunakan program komputer.<sup>46</sup>

#### **4.10 Etika Penelitian**

*Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran UNDIP / RSUP Dr. Kariadi Semarang. Pedoman pemeliharaan, pemberian intervensi, dan terminasi hewan coba sesuai dengan *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*<sup>28</sup> dengan rincian yang telah diuraikan di subbab sebelumnya.