

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini mencakup bidang Ilmu Kedokteran khususnya ilmu Kardiologi, Farmakologi, dan Patologi Anatomi.

3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang untuk perlakuan pada hewan coba dan pembedahan serta Laboratorium Patologi Anatomi rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang untuk pembuatan preparat histopatologi Miokardium. Waktu yang diperlukan untuk melakukan penelitian adalah 8 minggu dari bulan Februari hingga Mei 2016.

3.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan metode *post test only with control group design*.

3.4. Populasi dan sampel

3.4.1. Populasi target

Populasi target dari penelitian ini adalah tikus wistar berumur 6-8 minggu.

3.4.2. Populasi terjangkau

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Binatang coba kemudian dipilih secara acak dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.3. Sampel

3.4.3.1. Kriteria inklusi

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Umur 6-8 minggu
- 3) Berat tubuh 200-250 gram
- 4) Bergerak aktif
- 5) Belum pernah digunakan untuk penelitian

3.4.3.2. Kriteria eksklusi

- 1) Memiliki kelainan anatomis
- 2) Mati selama masa adaptasi

3.4.3.3. Kriteria dropout

Hewan coba yang mati dalam rentang waktu antara injeksi pertama hingga sebelum terminasi dianggap dropout dan diambil jantungnya untuk dinilai secara histopatologi

3.4.4. Cara sampling

Sampel yang diteliti pada penelitian ini diambil secara *simple random sampling*.

3.4.5. Besar sampel

Penentuan besar sampel dilakukan menurut ketentuan WHO, yaitu minimal 5 ekor tikus per kelompok. Dalam penelitian ini tikus yang akan digunakan sebanyak 7 ekor tiap kelompok untuk mempertimbangkan kemungkinan *drop out*.

3.5. Variabel penelitian

3.5.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama RIPC tikus wistar

3.5.2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah luas kematian otot jantung tikus wistar terinduksi isoproterenol setelah RIPC.

3.6 Definisi operasional

No	Variabel	Unit	Skala
1.	RIPC		
	Pengikatan lengan kiri depan tikus wistar selama beberapa waktu kemudian dilepas selama beberapa waktu dan diulang dalam beberapa siklus	Menit	Rasio
2.	Kematian otot jantung		
	Kematian pada otot jantung tikus wistar yang akan diukur dengan metode histopatologi.	Luas infark miokard / lapangan pandang	Rasio

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1. Bahan

- 1) (-)-Isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich, Singapura)
- 2) Tali pengikat
- 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) *Hematoxylin and eosin*
- 10) Pakan standar mencit (hi-pro vite)
- 11) Sekam kayu

3.7.2. Alat

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

3.7.3. Jenis data

Jenis data yang diperoleh adalah data primer.

3.7.4. Cara Kerja

3.7.4.1. Pemilihan Subjek

Hewan coba penelitian didapatkan dari Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang dan diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

3.7.4.2. Persiapan

- 1) Binatang coba diadaptasikan di kandang berukuran 25x25x25 cm agar dapat bergerak bebas.
- 2) Binatang coba juga diberi pakan standar selama 1 minggu.
- 3) Binatang coba dibagi secara *simple random sampling* ke dalam 2 kelompok berisikan 7 ekor menjadi kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2)

3.7.4.3. Pelaksanaan

- 1) Binatang coba dalam kelompok diberikan intervensi sesuai kelompoknya.

- 2) K sebagai kontrol diberi pakan standard dan diinduksi dengan isoproterenol untuk mendapatkan efek infark miokard.
- 3) Kelompok P1 diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus, 5 menit oklusi dan reperfusi selama 5 menit lalu diinduksi dengan isoproterenol.
- 4) Kelompok P2 diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus, 15 menit dan reperfusi selama 15 menit lalu diinduksi dengan isoproterenol.
- 5) Pengukuran luas kematian otot jantung dengan pemeriksaan patologi anatomi.

3.7.4.4.Pembedahan

Pembedahan²⁵ 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-tulang iga pada kedua sisi rangka dada dipotong.
- 4) Rangka dada diangkat.
- 5) Jantung dipisahkan dari selaput perikardium.
- 6) Pembuluh-pembuluh darah besar yang masuk/keluar atrium dan ventrikel jantung dipotong.

- 7) Dilakukan eksisi pada jantung.
- 8) Darah yang masih tersisa dikeluarkan dengan melakukan kompresi pada jantung dan dibersihkan dengan tisu yang kering dan bersih untuk menyerap keluar cairan yang masih tersisa.^{26,27}

3.7.4.5. Pembuatan Preparat Histopatologi Miokardium

Pembuatan preparat histopatologi²⁸ miokardium dikerjakan oleh tenaga ahli bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Nasional Diponegoro.

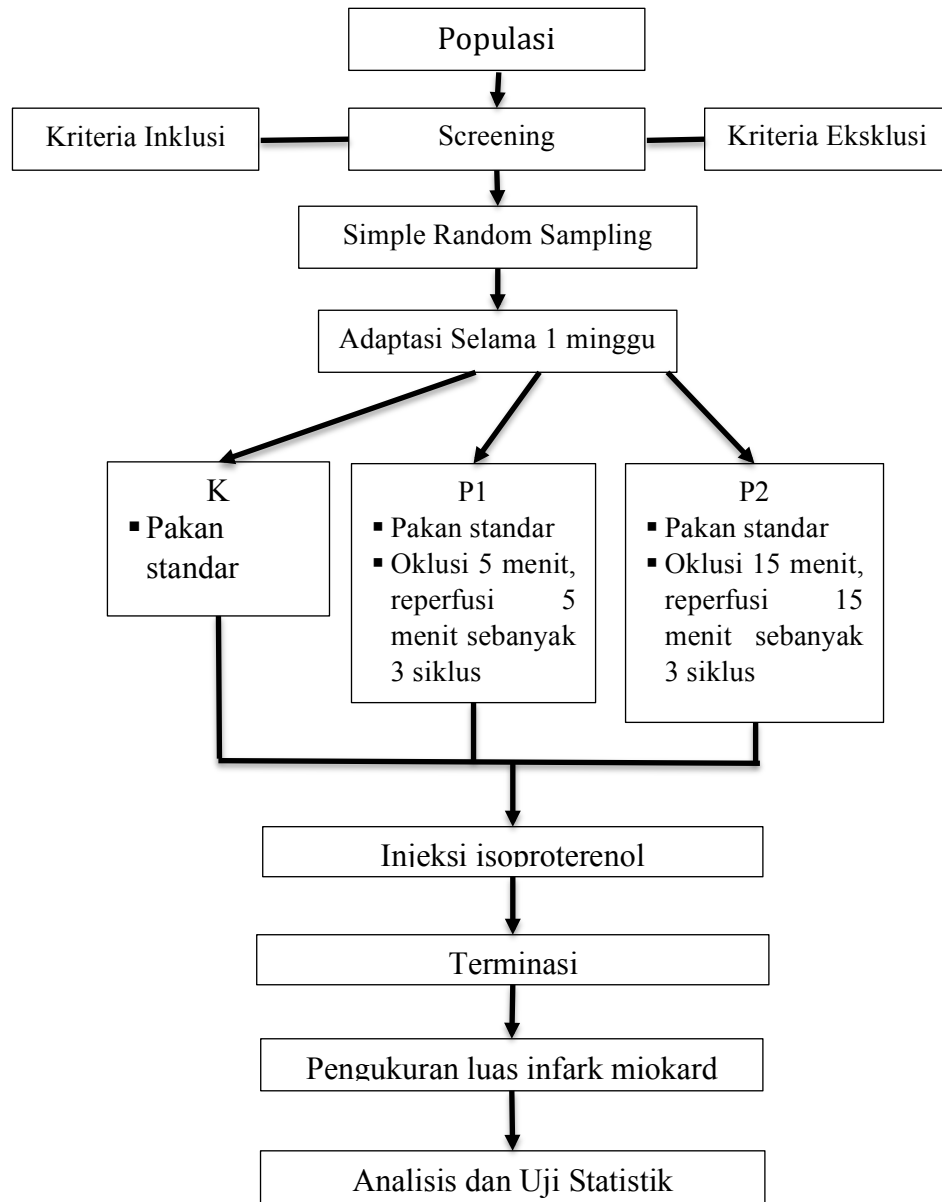
Proses pembuatan adalah sebagai berikut:

- 1) Organ jantung dipotong secara melintang pada ventrikel kiri bagian apeks, pertengahan, dan basal. Jantung direndam dan diinjeksi bagian dalamnya dengan 10 ml larutan BNF 10% untuk difiksasi selama dua hari pada suhu ruang. Selanjutnya, jantung diblok menggunakan parafin, dipotong 3-5 μm dan potongan tersebut dilekatkan pada kaca obyek.
- 2) Blok kemudian dicat dengan *hematoxylin and eosin* (H&E).
- 3) Preparat didehidrasi, dibersihkan, dan ditutup dengan kaca penutup.

3.7.4.6. Pengukuran Luas Kematian Otot Jantung

Pengukuran luas kematian otot jantung dilakukan pada foto preparat histopatologi jaringan yang telah dicat dengan H&E. Foto didapat menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 40x200 yang dilengkapi kamera digital dan image processor. Skoring kejadian infark dilakukan dengan memberikan skor (0) bila tidak ada kerusakan, skor (1) bila kerusakan kurang dari 25%, skor (2) bila kerusakan 25-50 %, skor (3) bila kerusakan 50-75% dan skor (4) bila kerusakan 75-100%.²⁹

3.8 Alur penelitian



Gambar 5: Alur Penelitian

3.9 Analisis data

Data yang terkumpul akan terlebih dahulu dimasukkan ke dalam file *Microsoft Excel*. Pengelolaan data lebih lanjut akan menggunakan program *IBM SPSS Statistics*.

Data primer berupa gambaran histopatologi kematian otot jantung yang diperoleh setelah dilakukan intervensi akan diolah menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*. Apabila uji normalitas menunjukkan persebaran data yang normal maka akan dilakukan pengolahan data dengan uji *one way Anova* dan *post hoc*. Apabila data tidak berdistribusi normal maka data dianalisis dengan uji *Kruskal Willis* dan *Mann Whitney-U*.

Uji hipotesis dianggap signifikan secara statistik apabila $p < 0.05$ dengan interval kepercayaan sebesar 95%.

3.10 Etika penelitian

Ethical clearance dimintakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Universitas Diponegoro dan RSUP dr. Kariadi sebelum penelitian dilakukan dengan nomer 536/EC/FK-RSDK/2016.