

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama enam bulan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

3.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan yaitu tikus dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang berusia 3-4 bulan, berat badan 150-200 gram dan sehat. Kriteria inklusi subjek penelitian yaitu tikus jantan yang sehat dimana kondisi bulu bersih, tidak basah atau lengket, tikus aktif bergerak, makan, minum dan tidur sesuai siklus hidupnya. Kriteria eksklusi adalah tikus yang mati atau sakit selama penelitian. Perhitungan sampel menggunakan rumus *Resource Equation* (Charan *et al.*, 2013), yaitu

$$\begin{aligned} E &= N - T \\ 10 - 20 &= (N - 1) - (T - 1) \\ 20 &= (N - 1) - (4 - 1) \\ N &= 24 \text{ ekor} \end{aligned}$$

Keterangan :

E = komponen error, digunakan untuk estimasi varian, yaitu dianggap optimal jika dalam rentang 10-20

N = jumlah unit eksperimen

T = jumlah kelompok treatment

Berdasarkan rumus tersebut jumlah sampel yang digunakan yaitu 24 ekor hewan coba. Subjek akan dibagi menjadi 4 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 6 tikus yaitu

1. Kelompok A merupakan kelompok *shame operated*.
2. Kelompok B merupakan kelompok perlakuan dengan durasi iskemia 5 menit reperfusi 24 jam.
3. Kelompok C merupakan kelompok perlakuan dengan durasi iskemia 10 menit reperfusi 24 jam.
4. Kelompok D merupakan kelompok perlakuan dengan durasi iskemia 20 menit reperfusi 24 jam.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah durasi oklusi 5, 10, dan 20 menit dengan reperfusi 24 jam

3.4.2. Variable Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah neuroglia pada korteks pasca ligase transien arteri carotis comunis bilateral.

3.5. Definisi Operasional

1. Durasi iskemia adalah lamanya waktu pengikatan arteri carotis comunis bilateral, yaitu selama 5, 10 dan 20 menit.
2. Durasi reperfusi 24 jam adalah waktu tikus dibiarkan hidup setelah pelepasan ikatan arteri carotis comunis bilateral, yaitu selama 24 jam.
3. BCCAO adalah pengikatan arteri carotis comunis bilateral dengan *clamp vascular*.
4. Jumlah neuroglia pada korteks adalah jumlah neuroglia yang terlihat dari gambaran histopatologis dengan pewarnaan toluidine blue di korteks pada setiap kelompok percobaan pasca ligasi dengan durasi iskemia 5, 10 dan 20 menit dan reperfusi 24 jam. Sel neuroglia merupakan penyokong sel

neuron yang berbentuk oval atau bulat. Sel yang dihitung adalah sel yang sehat. Sel yang sehat yaitu sel yang mengandung anak inti jelas

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat penelitian :

- a. Kandang untuk tikus
- b. Meja operasi steril merk *Labtech*
- c. Aluminium foil
- d. Lampu penghangat
- e. Perekat
- f. Alat bedah minor
- g. Kapas
- h. Spuit injeksi 1 ml
- i. Benang silk dan cutgut
- j. Pot organ
- k. Infus set (peralatan untuk Perfusi trankardial
- l. *Clamp vascular* untuk ligasi
- m. Spuit sonde

3.6.2. Bahan penelitian :

- a. Tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berumur 3-4 bulan dengan berat badan 150-200 gram yang didapatkan dari Laboratorium Fakultas Kedokteran UII
- b. Betadin (Bahan desinfektan)
- c. Ketamin (Obat Anestesi)
- d. Formalin
- e. NaCl 0,9%
- f. Pakan
- g. Akuades

3.7. Tahap Penelitian

3.7.1. Pembuatan Blok Parafin dan Sediaan Histologis

Sebelum dilakukan pembuatan blok parafin, dilakukan pemotongan jaringan otak tikus. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan formalin.

Selanjutnya blok paraffin tersebut dibuat sediaan histopatologi dengan ketebalan 3-4 μm dengan pewarnaan *toluidine blue* 0,1%. Aliri dengan akuades selama 10 menit dan bilas dengan air destilasi. Segera keringkan dan tetesi dengan etil alcohol. Hasil pengecatan ini ditunjukkan dengan warna biru gelap (Sridharan & Shankar, 2012). Proses tersebut dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.

3.7.2. Perhitungan Jumlah Neuroglia

Penghitungan jumlah neuroglia dilakukan sebagai berikut:

1. Dari satu subjek penelitian, diambil satu preparat pewarnaan *toluidine blue*. Preparat yang diambil yaitu yang terlihat jelas pada region korteks serebri yang sesuai dengan atlas anatomi.
2. Masing-masing preparat diamati dengan mikroskop CX 21 yang terhubung dengan kamera optilab dan perangkat komputer yang memiliki *software Image Raster & Optilab Viewer*.
3. Masing-masing preparat diambil foto sebanyak 10 foto secara *random* di regio korteks serebri dengan perbesaran 1000 kali (Flaccavento *et al.*, 2010).
4. Kemudian masing-masing preparat dihitung jumlah neuroglia striatum menggunakan perangkat lunak Image Raster V.21.
5. Objek hitunganya yaitu neuroglia yang memiliki inti jelas.

Jumlah neuroglia yang sehat pada tiap subjek penelitian akan dijumlahkan sesuai dengan kelompoknya masing-masing. Kemudian akan diambil rata-rata jumlah sel pada tiap kelompok dan dimasukkan dalam uji statistika (Liu, Xu and Chen, 2013)

3.8. Analisis Data

Analisa data dilakukan dengan perangkat lunak statistik. Langkah pertama akan dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk Test*. Apabila data terdistribusi normal maka dilakukan *One Way Analysis of Variance (ANOVA) test*. Kemudian, dilakukan uji varian untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data mempunyai varian yang sama dengan *Levene's test*. Apabila varian

sama, maka setelah dilakukan *One Way ANOVA* maka dilakukan *Post Hoc Bonferonni* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Apabila varian tidak sama, maka dilakukan *one way ANOVA* dan *Post Hoc Tamhane's*. Apabila data tidak terdistribusi normal maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan distribusi data. Apabila data sudah terdistribusi normal maka analisis analitik dapat menggunakan *One Way Analysis of Variance (ANOVA) test*. Akan tetapi jika data tetap tidak terdistribusi normal, maka analisis analitik dilakukan dengan uji non parametrik *Kruskall-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann Whitney Test* (Dahlan, 2014).

3.9. Etika Penelitian

Permohonon ijin diajukan terlebih dahulu sebelum melaksanakan penelitian. Permohonan ijin ditujukan untuk Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia sebagai tempat uji kelayakan etik. Langkah-langkah pengajuan *ethical clearance* :

1. Pembuatan proposal dan memberikan kepada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia serta memberi keterangan dan jawaban terhadap pertanyaan-pertanyaan yang diajukan agar penelitian tidak melanggar kelayakan etik.
2. Permohonan izin *ethical clearance* diajukan kepada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
3. Penelitian akan dilaksanakan setelah surat kelayakan *ethical clearance* dikeluarkan.