

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Pre and Post-Test Controlled Group Design*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan Tikus Wistar jantan dengan usia 6-7 minggu. Tikus Wistar jantan dipilih sebagai hewan coba karena terbukti dari penelitian sebelumnya tikus tersebut dapat terinduksi Parkinson yang ditunjukkan dengan gejala penurunan fungsi motorik pada tikus, serupa dengan gejala motorik Penyakit Parkinson pada manusia (Przedborski, 2001). Pemilihan usia 6-7 minggu dikarenakan pada usia tersebut masih belum terdapat pengaruh dari hormon-hormon pertumbuhan dan seksual yang dapat menjadi faktor perancu (*confounding*) selama penelitian.

Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian eksperimental untuk mencegah terjadinya bias. Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi:

1. Tikus strain Wistar jantan

2. Tikus berwarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.
3. Umur 6-7 minggu
4. Berat rata-rata 150 gram

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau sakit selama penelitian berlangsung

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan sehingga tikus Wistar jantan dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok berdasarkan penginduksian parkinson dan pemberian larutan *Saccharomyces cerevisiae*. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1. Pembagian Kelompok Tikus Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	Tidak diberikan perlakuan apapun
Kontrol Positif	Injeksi rotenone tanpa diberikan larutan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kelompok A	Injeksi rotenone + larutan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 18 mg/kgBB
Kelompok B	Injeksi rotenone + larutan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36 mg/kgBB
Kelompok C	Injeksi rotenone + larutan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 72 mg/kgBB

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

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

(p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan)

Pada penelitian ini $p = 5$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$n-1 \geq 15/4$$

$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n \geq 4,75$$

Berdasarkan perhitungan diatas dapat disimpulkan bahwa jumlah pengulangan yang diperlukan adalah 4,75 ~ 5 pengulangan. Sehingga jumlah tikus Wistar jantan yang digunakan sebanyak 25 ekor.

1.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret sampai dengan Mei 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas motorik tikus

Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah pemberian larutan *Saccharomyces cerevisiae*

4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan berusia 6-7 minggu. Tikus diperoleh dari peternakan tikus di Purwokerto. Kemudian tikus dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu untuk penyesuaian tempat sebelum memulai penelitian.

2. Induksi Parkinson

Induksi parkinson pada hewan coba menggunakan rotenone yang telah menjadi standar sebagai bahan penginduksi Parkinson pada berbagai penelitian. Rotenone diinjeksikan secara subkutan 2 hari sekali selama 12 hari. Dosis yang diberikan sebanyak 3 mg/kgBB setiap injeksi (Sharma *et al.*, 2012).

3. Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae dengan dosis 18 mg/kgBB; 36 mg/kgBB; 72 mg/kgBB untuk kelompok A, B, dan C dilarutkan dalam aquades. Setiap kali pemberian dosis perlakuan pada satu hewan coba, *Saccharomyces cerevisiae* dilarutkan dalam 2 cc akuades kemudian diberikan ke tikus menggunakan sonde makan tikus

4. Tes Aktivitas Motorik

Pengetesan dilakukan dengan metode *cylinder test*. Penggunaan kaki depan tikus untuk menahan berat badannya pada waktu eksplorasi dapat dilihat dengan menempatkan tikus di dalam silinder transparan berdiameter 20 cm dan tinggi 30cm selama 3 menit. Jika kedua kaki

depan tikus menyentuh dinding tabung dan menapak pada dasar tabung, dapat dihitung 1 kali pada tes ini.

5. Kontrol Negatif

Kelompok kontrol negatif adalah kelompok tikus penelitian yang tidak diberikan apapun baik rotenone maupun *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Kontrol Positif

Kelompok kontrol positif adalah kelompok tikus penelitian yang hanya diberikan rotenone saja sebagai bahan induksi parkinson, tanpa diberikan larutan *Saccharomyces cerevisiae*.

7. Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan adalah kelompok tikus penelitian yang diberikan injeksi rotenone dan diberikan larutan *Saccharomyces cerevisiae*. Dalam penelitian ini, kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok sesuai dengan dosis *Saccharomyces cerevisiae* yang diberikan yaitu 18, 36 dan 72 mg/kgBB.

7.6 Bahan dan Alat

1. Perawatan tikus

Alat : kandang tikus, tempat minum, timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan

Bahan : pelet, terigu, air, dan sekam

2. Induksi Parkinson pada Hewan Coba

Alat : spuit insulin, kassa, alkohol

Bahan : *Rotenone* (R8875 – 1G) yang dibeli dari Sigma Singapura,
olive oil

3. Pembuatan Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Alat : gelas erlenmeyer, timbangan

Bahan : *Saccharomyces cerevisiae*, akuades

4. Pemberian larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Alat : sonde makan tikus

Bahan : larutan *Saccharomyces cerevisiae*

5. Cylinder Test

Alat : silinder transparan berdiameter 20 cm dan tinggi 30cm

Bahan : -

4.7 Prosedur Penelitian

1. Adaptasi

Adaptasi hewan coba dilakukan selama 1 minggu. Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 30 gram makanan. Hewan coba juga diberikan minuman secara *ad libitum*.

2. Pemberian *Rotenone* pada Hewan Coba

Penginduksian parkinson menggunakan *rotenone* yang diinjeksi secara subkutan. Injeksi dilakukan 6 dosis dalam 12 hari. Setiap injeksi dibutuhkan dosis sebesar 3 mg/kgBB

3. Penentuan Dosis *Saccharomyces cerevisiae*

Berdasarkan penelitian Ito *et al.*, 2009, *Beta glucan* sebesar 8 mg/kgBB pada tikus dapat meningkatkan G-CSF secara signifikan. Kandungan *beta glucan* pada *Saccharomyces cerevisiae* sebesar

45%-98%. Berarti didapatkan 45 mg *Beta glucan* dalam 100 mg *Saccharomyces cerevisiae* (Kusmiati *et al.*, 2007)

KONVERSI

$$45 : 8 = 100 : X$$

$$45 X = 800$$

$$X = 17,78 \sim 18 \text{ mg/kgBB (dosis I} \rightarrow \text{Kelompok A)}$$

Jadi, 8 mg/kgBB bisa didapatkan dari 18 mg/kgBB *Saccharomyces cerevisiae*

Dosis selanjutnya ditentukan menggunakan deret hitung ($2n$), jadi :

Dosis II \rightarrow Kelompok B = 36 mg/kgBB

Dosis III \rightarrow Kelompok C = 72 mg/kgBB

4. *Pembuatan Larutan Saccharomyces cerevisiae*

Beta glucan merupakan bahan yang larut air (Anttila, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* dibuat menjadi larutan dengan cara melarutkannya dengan akuades. Pertama, *Saccharomyces cerevisiae* ditimbang sesuai dosis perlakuan yaitu 18 mg/kgBB, 36 mg/kgBB dan 72 mg/kgBB sampel kering. Lalu masing-masing dosis tersebut ditambahkan akuades dengan volume 2 cc untuk satu hewan coba pada masing-masing perlakuan dan dikocok sampai benar-benar tercampur. Larutan diberikan ke tikus dengan sonde makan tikus setiap hari selama 4 minggu.

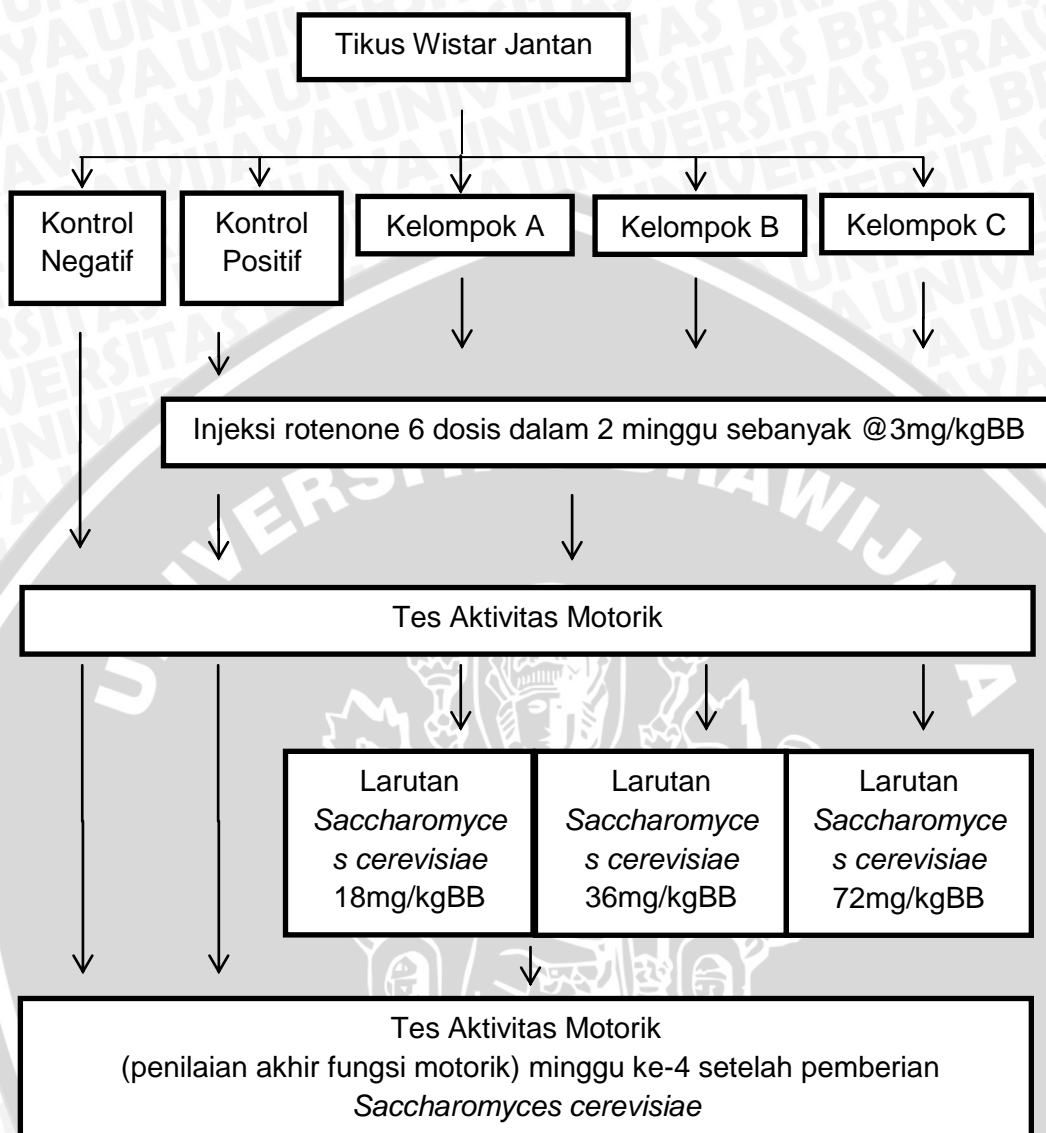
5. Tes Aktivitas Motorik

Uji perilaku dilakukan dengan metode *cylinder test*. Penggunaan kaki depan tikus untuk menahan berat badannya pada waktu eksplorasi

dapat dilihat dengan menempatkan tikus di dalam silinder transparan berdiameter 20 cm dan tinggi 30cm selama 3 menit (Schaller *et al.*, 2007). Bentuk silinder ini memacu tikus untuk melakukan eksplorasi vertikal pada dinding silinder. Penggunaan kaki depan tikus dilihat pada saat tikus melakukan eksplorasi vertikal. Cara penilaian adalah dengan melihat apakah kedua kaki depan menempel pada dinding silinder, jika salah satu kaki depan tidak menempel maka bisa dikatakan bahwa tikus mengalami *impairment* (Gonzalez, 2003). Dalam tes ini yang dilihat adalah satu jenis perilaku yang meliputi kontak setiap kaki depan menyentuh dinding tabung dan penggunaan setiap kaki depan menyentuh dasar tabung selama 3 menit (Kim *et al.*, 2002).



Alur kerja penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Kerja Penelitian

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diambil berupa data-data hasil tes aktivitas motorik setelah dilakukan induksi rotenone pada minggu ke-1 dan setelah minggu ke-4. Kemudian data-data tersebut dianalisis secara statistik menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* dengan menggunakan uji sebagai berikut :

- Uji normalitas (uji Kolmogorov-Smirnov atau uji Shapiro Wilk): bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki sebaran normal. Jika sebaran data normal, analisa dilanjutkan dengan uji ANOVA. Jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varian homogen, analisa dilanjutkan dengan ANOVA. Jika varian tidak homogen, digunakan uji non parametrik.
- Uji *One-way Anova*: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok. Uji alternatif (non parametrik): uji Kruskal Wallis.
- Analisis *post hoc (Tukey HSD)*: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes anova. Analisis *post hoc* untuk non parametrik (Kruskal-Wallis): uji Mann-Whitney.
- Uji korelasi Pearson : bertujuan untuk menguji apakah terdapat korelasi yang signifikan antara pemberian *Saccharomyces cerevisiae* terhadap hasil behaviour test. Untuk non parametrik (Kruskal-Wallis) menggunakan uji korelasi Spearman.