

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan randomized *post-test only controlled group design* pada tikus sebagai hewan coba. Tiga puluh ekor tikus strain Wistar jantan yang telah menjalani aklimatisasi selama 2 minggu dengan siklus gelap terang masing-masing 12 jam setiap harinya dibagi menjadi 4 kelompok secara randomisasi. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yaitu kelompok kontrol negatif, perlakuan A, perlakuan B, dan perlakuan C. Semua kelompok kecuali kontrol negatif kemudian diinduksi stres menggunakan *platform* tidak stabil setinggi 1 meter dengan durasi yang berbeda sesuai dengan kelompok perlakuannya. Kelompok A diinduksi menggunakan alat pembangkit stres selama 30 menit, kelompok B selama 60 menit, kelompok C selama 90 menit. Segera setelah diinduksi stres, tikus dibunuh untuk dilakukan pembedahan. Pada pembedahan akan diambil otak tikus untuk dibuat preparat histologi dengan pewarnaan toluidine blue. Kemudian preparat dilihat dibawah mikroskop untuk diidentifikasi serta dihitung secara manual jumlah sel mast yang mengalami degranulasi dan yang tidak mengalami degranulasi pada talamus dan hipokampus tikus yang akan dilakukan di Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya .

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas

Muhammadiyah Malang dengan usia 6 minggu. Tikus strain Wistar merupakan tikus yang sering digunakan untuk mempelajari sel mast otak dan fisiologi stres (Strbian et al. 2007; Nishioka et al. 1993; Silverman et al. 2000; Theoharides et al. 2008).

4.2.2 Sampel Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jantan strain wistar usia 6 minggu tanpa kelainan anatomis
- Sehat selama masa aklimatisasi yang berlangsung 2 minggu

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus memiliki kelainan anatomis dan perkembangan
- Berat badan tidak meningkat, sakit atau mati selama masa aklimatisasi yang berlangsung 2 minggu

4.2.2.3 Perolehan Sampel

Teknik yang digunakan untuk pemilihan sampel dari populasi adalah randomisasi, karena teknik ini dapat meminimalisir bias. Jumlah minimal sampel yang dibutuhkan dihitung menggunakan rumus dari Federer, yaitu $p(n-1) \geq 15$, dengan p merupakan jumlah perlakuan dan n adalah jumlah sampel per kelompok. Pada penelitian ini jumlah perlakuan adalah 4, sehingga didapatkan nilai n sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15; 4n-4 \geq 15; 4n \geq 19$$

$$n = 4,75 \sim 5$$

jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 5 tikus per kelompok perlakuan. Pada penelitian ini, jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 20 tikus (Dahlan, 2013).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- Kontrol negatif: tikus yang tidak diinduksi stres
- Kelompok perlakuan A: tikus yang diinduksi stres selama 30 menit
- Kelompok perlakuan B: tikus yang diinduksi stres selama 60 menit
- Kelompok perlakuan C: tikus yang diinduksi stres selama 90 menit

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah persentase sel mast yang mengalami degranulasi

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi Histologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Desember tahun 2015 sampai Februari tahun 2016

4.5 Definisi Operasional

- Tikus strain Wistar yang digunakan memiliki jenis kelamin jantan dan berasal dari Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang
- Alat pemicu stres dibuat berdasarkan deskripsi Daeng et al., yaitu sebuah *platform* transparan tidak stabil diatas tiang setinggi 100cm yang diletakkan dibawah sebuah lampu dengan daya 60watt (Daeng et al., 2016)
- Kondisi stres akut pada tikus dikonfirmasi dengan adanya gejala stres pada tikus yaitu *freezing*, defekasi, urinasi dan piloreksi saat berada diatas alat penginduksi stres
- Untuk mewakili populasi sel mast, diambil 3 irisan otak dari lokasi yang diperkirakan sama dari setiap tikus

- Penghitungan sel mast otak dilakukan secara manual menggunakan mikroskop pada hipokampus dan talamus tikus yang kemudian akan dibedakan yang mengalami degranulasi dan tidak
- Untuk mengetahui pengaruh durasi stresor pada stres akut terhadap aktivasi sel mast, dihitung persentase sel mast otak yang mengalami degranulasi.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Tikus

Pada pemeliharaan tikus diperlukan kandang pemeliharaan tikus, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, tempat makan dan pakan standar tikus.

4.6.2 Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi

Alat dan bahan yang digunakan adalah tempat cuci tangan, jas laboratorium, masker, handscoen, alkohol 70%, kapas, dan sabun antiseptik.

4.6.3 Alat dan Bahan Pengambilan Otak Tikus dan Pembuatan Preparat

Untuk prosedur pengambilan otak tikus dibutuhkan *freezer*, alas bedah, scalpel, *container*, gunting dan tang.

4.6.4 Alat dan Bahan Induksi Stres Tikus

Alat yang digunakan adalah alat penginduksi stres berupa *platform* tidak stabil setinggi 1 meter sesuai deskripsi Daeng et al., (2016), lampu 60 watt dan *stopwatch*.

4.6.5 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Histologi

Alat dan bahan yang digunakan adalah slide, object glass, wadah, parafin, alkohol dengan konsentrasi 35%, 60%, 80%, 90%, 95% dan 99%, pewarna *toluidine blue*, *xylene*, air, *microtome*, dan *entellan*.

4.6.6 Alat dan Bahan Penghitungan Sel Mast Otak

Alat yang digunakan adalah mikroskop cahaya dan alat tulis.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Pemeliharaan dan Seleksi Tikus

Tikus ditimbang lalu diberi tanda di ekornya. Kemudian tikus dipelihara selama 14 hari dalam kandang plastik berukuran 30 cm x 12 cm x 35cm dengan alas sekam yang diganti setiap tiga hari dan diberi penutup anyaman kawat. Satu kandang berisi 5 tikus. Tikus diberi siklus sinar terang gelap masing-masing 12 jam, makan dan minum yang cukup serta situasi yang tenang. Setelah 14 hari tikus ditimbang ulang untuk seleksi tikus yang akan digunakan.

4.7.2 Prosedur Pemaparan Tikus Terhadap Alat Pemicu Stres Akut

Tikus yang lolos seleksi diletakkan diatas alat penginduksi stres dibawah lampu 60 watt selama durasi yang telah ditentukan di kelompok perlakuannya.

4.7.3 Prosedur Pembedahan Tikus

Tikus yang telah selesai diinduksi stres segera dimatikan dengan cara dislokasi vertebra servikal kemudian diletakkan pada meja bedah untuk diambil otaknya.

4.7.4 Prosedur Dehidrasi Jaringan

Jaringan di rendam menggunakan alkohol secara bertingkat mulai dari kadar 35%, 60%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99% dan 99% masing masing selama 1 menit.

4.7.5 Prosedur Embedding Jaringan dalam Paraffin

Jaringan yang telah terdehidrasikan direndam dalam cetakan berisi parafin lalu dimasukkan kedalam air es, selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan dalam freezer.

4.7.6 Prosedur Pembuatan Irisan Histologi

Jaringan diletakkan pada microtome kemudian diiris dan direkatkan pada slide menggunakan entellan.

4.7.7 Prosedur Rehidrasi Preparat Histologi

Slide direndam dalam xylene 100% selama 10 menit kemudian diulangi kembali dalam xylene 100% baru selama 10menit. Kemudian direndam dalam ethanol masing-masing selama satu menit dimulai dari konsentrasi 99%, 99%, 99%, 95%, 90%, 80% 60% dan 35%. Kemudian slide direndam selama minimal 5 menit dalam air tanpa melebihi 5 jam.

4.7.8 Prosedur Pewarnaan *Toluidine Blue*

Slide yang telah terrehidrasi kemudian segera ditetesi dengan larutan *toluidine blue* selama 5 detik kemudian dibilas dengan air sebanyak 2 kali.

4.7.9 Prosedur Penghitungan Sel Mast Otak

Slide diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran objektif 40x dan okuler 10x. Hippocampus dan talamus kemudian diidentifikasi dan dihitung serta dibedakan sel mast yang telah mengalami aktivasi dan belum mengalami aktivasi.

4.7.10 Prosedur Pengolahan Data

Data yang didapat berupa jumlah sel mast yang mengalami degranulasi dan tidak terdegranulasi dari hipokampus dan talamus tikus akan dikonversi menjadi persentase sel mast yang mengalami aktivasi dan akan diasumsikan

normalitas distribusi data dan homogenitas ragam datanya. Apabila data normal dan homogen maka akan dianalisis menggunakan uji hipotesis *one-way ANOVA*. Bila tidak normal atau tidak homogen, maka menggunakan uji hipotesis *Kruskal-Wallis*. Perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) akan dilanjutkan dengan *Post-hoc* (*LSD*) dan penghitungan nilai korelasi *Pearson*.

4.8 Bagan Alur Penelitian

