

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian adalah eksperimen dengan metode desain paralel. Menggunakan 20 ekor mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur Balb/c yang dibagi menjadi 4 kelompok dengan 1 kontrol, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor dipilih dengan menggunakan dengan metode acak. Lama pemberian minuman beralkohol selama 30 hari dan dilihat gambaran mikroskopis dengan metode *double blinded*.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan selama bulan November–Desember 2009 di Laboratorium Program Studi Pendidikan Dokter Unila dan pembuatan sediaan mikroskopis otak dilaksanakan di Laboratorium Patologi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung.

### C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan berumur 3-4 bulan yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor. Sampel penelitian sebanyak 20 ekor yang dibagi dalam 4 kelompok secara acak, sesuai dengan rumus Federer untuk penentuan jumlah sampel pada uji eksperimental, yakni  $t(n-1) > 15$ . Dimana  $t$  merupakan jumlah kelompok perlakuan, dan  $n$  adalah jumlah pengulangan atau jumlah sampel setiap kelompok.

$$4(n-1) > 15$$

$$4n-4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

sehingga didapat jumlah sampel sebanyak 5 ekor setiap kelompok.

#### 1. Kriteria Inklusi:

- a. Sehat
- b. Memiliki berat badan antara 20-30 gram.
- c. Jenis kelamin jantan.
- d. Berusia sekitar  $\pm$  3-4 bulan.

#### 2. Kriteria Eksklusi:

- a. Sakit (penampakan rambut kusam, rontok atau botak, aktivitas kurang atau tidak aktif).

- b. Terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di laboratorium.

#### **D. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **1. Alat Penelitian:**

- a. Kandang hewan uji (mencit) yang digunakan sebagai tempat perlakuan mencit.
- b. Timbangan digital Mettler Toledo dengan tingkat ketelitian 0,01 g untuk menimbang berat badan mencit.
- c. S spuit oral 1 cc, untuk mencekoki minuman beralkohol.
- d. Minor set, untuk mengambil serebelum mencit.
- e. Kertas dan alkohol.

##### **2. Bahan penelitian:**

- a. Minuman beralkohol, merk X dengan kadar 14,8% yang didapat dari penjual di Bandar Lampung.
- b. Aquades, untuk perlakuan kontrol.

##### **3. Bahan Kimia:**

- a. Kloroform, untuk membius mencit.
- b. Formalin 10%, untuk mengawetkan serebelum mencit.
- c. Alkohol 80%, Alkohol 90 %, Alkohol 95%, Alkohol Absolut I, Alkohol Absolut II, Alkohol Absolut III, Alkohol Absolut IV, Xylol I, Xylol II, Xylol III, Xylol IV, Xylol V, *Harris Hematoxylin*, *Acid*

alkohol, *Eosin*, Alkohol 96% I, Alkohol 96% II, *canada balsam* dan paraffin dalam proses pembuatan sediaan mikroskopis.

## **E. Prosedur Penelitian**

### **1. Prosedur Penentuan Dosis Minuman Beralkohol**

Cara perhitungan dosis I, dosis II, dan dosis III:

Dosis minuman beralkohol yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan dari hasil survey yang telah dilakukan di semua terminal di Bandar Lampung.

Adapun hasil yang diperoleh dari survey tersebut adalah:

- a. Minuman yang paling banyak dikonsumsi masyarakat adalah minuman beralkohol merk X dengan kadar alkohol 14,8 %.
- b. Dosis minimal yang biasa digunakan pada masyarakat yang setiap hari mengkonsumsi minuman beralkohol, yakni 1-2 botol besar per hari sebanyak 620 mL/botol.

Volume minuman beralkohol ini adalah 620 ml dalam 1 botol besar, sehingga dosis yang biasa dikonsumsi masyarakat adalah 620-1240 ml.

Bila dikonversikan dengan angka konversi 0,0026 (Sastramihardja, 2004)

$$\begin{aligned} &= \text{konversi} \times \text{dosis (mL)} \\ &= 0,0026 \times 620 \text{ mL} \\ &= 1,612 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &= \text{konversi} \times \text{dosis (mL)} \\ &= 0,0026 \times 1240 \text{ mL} \\ &= 3,224 \text{ mL} \end{aligned}$$

Namun, mengingat maksimal dosis pemberian per oral pada mencit, yaitu 1 ml/ pemberian (Sastramihardja, 2004) yang tidak mencukupi apabila menggunakan dosis tersebut, maka peneliti hanya mengambil  $\frac{1}{2}$  dosis dari dosis hasil survey yaitu 310 ml. Kemudian dosis ini dikonversikan ke mencit.

Dosis yang digunakan pada mencit

$$\begin{aligned} &= \text{Konversi} \times \text{dosis (ml)} \\ &= 0,0026 \times 310 \text{ ml} \\ &= 0,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

Didapatkan dosis minuman beralkohol yang digunakan sebesar 0,80 ml, adalah dosis II.

Rumus untuk menentukan faktor peningkatan dosis adalah (Thomson, 1985):

$$F = n - 1 \sqrt{\frac{D_{maks}}{D_{min}}}$$

Keterangan:

F = Faktor peningkatan dosis

n = Banyak variasi dosis

Dmaks = Dosis maksimal

Dmin = Dosis minimal

$$\begin{aligned} F &= \sqrt[3-1]{\frac{2}{1}} \\ &= 2\sqrt{2} \\ &= 1,41 \end{aligned}$$

Adapun hasil dari perhitungan tersebut, maka didapatkan faktor peningkatan dosis sebesar 1,41.

Berdasarkan perhitungan Thomson, maka diperoleh dosis perlakuan yakni:

$$\text{- Kelompok I : } \frac{0,80}{1,41} = 0,56 \text{ mL}$$

$$\text{- Kelompok II : } 0,80 \text{ ml}$$

$$\text{- Kelompok III: } 0,80 \times 1,41 = 1,12 \text{ mL}$$

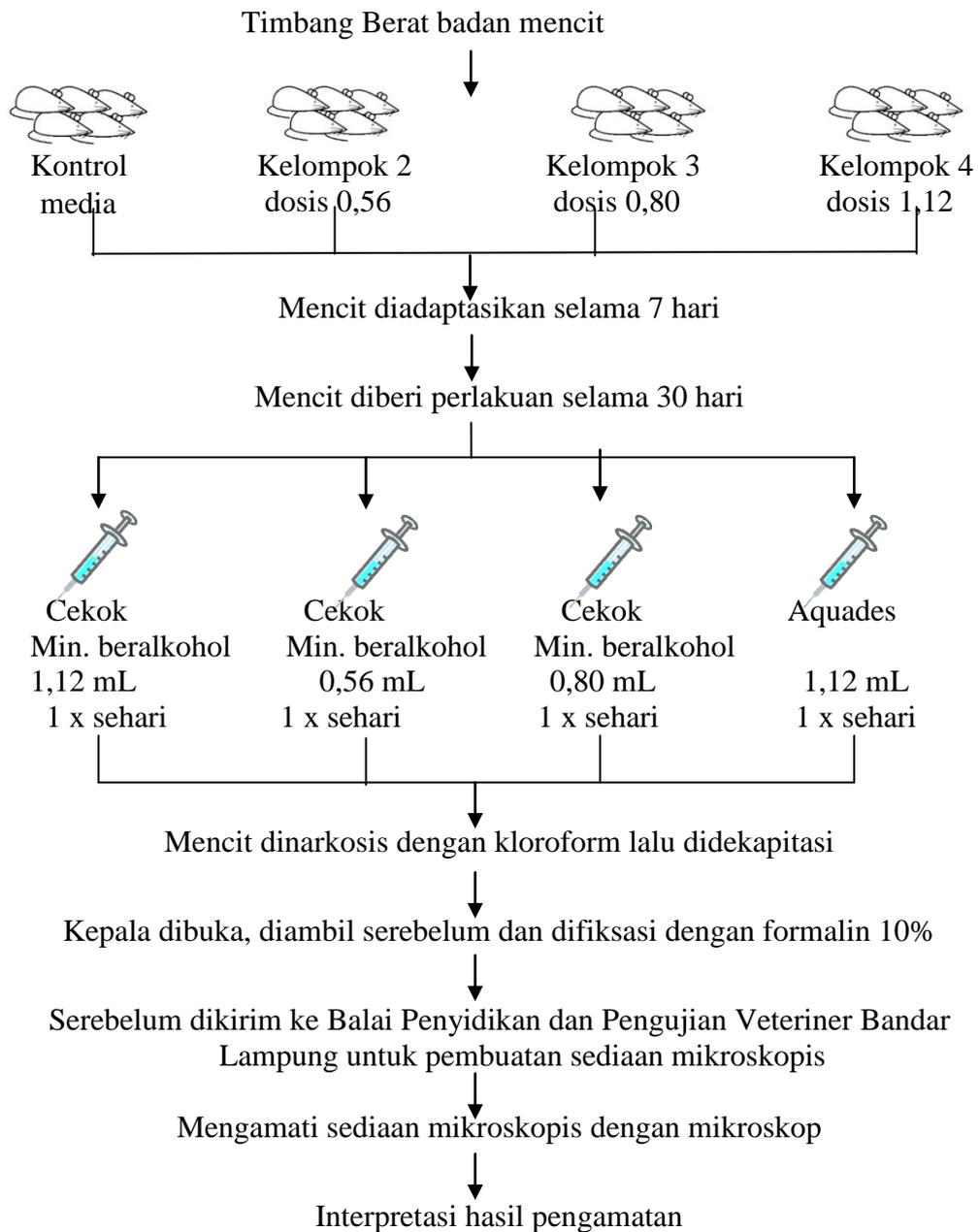
## 2. Prosedur Penelitian

a. Sebanyak 20 ekor mencit, dikelompokkan dalam 4 kelompok.

Kelompok pertama sebagai kontrol media, hanya diberi aquades,

kelompok kedua adalah kelompok dengan pemberian dosis I minuman beralkohol sebanyak 0,56 mL, kelompok ketiga adalah kelompok dengan pemberian dosis II minuman beralkohol sebanyak 0,80 mL, kelompok keempat adalah kelompok dengan pemberian dosis III minuman beralkohol sebanyak 1,12 mL, kemudian mencit akan diletakkan di kandang dalam laboratorium selama 7 hari sebagai adaptasi.

- b. Mengukur berat badan mencit sebelum perlakuan.
- c. Mencekoki mencit dengan minuman beralkohol selama 30 hari, satu kali setiap hari. Mencit tetap diberikan makan dan minum, *ad libitum*.
- d. Setelah 30 hari, pemberian minuman beralkohol dihentikan, 5 ekor mencit dari tiap kelompok dinarkosis dengan kloroform.
- e. Mencit didekapitasi, diambil serebelum untuk dibuat sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin.
- f. Sampel serebelum ini difiksasi dengan formalin 10%. Selanjutnya sampel ini dikirim ke Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Bandar Lampung untuk pembuatan sediaan mikroskopis serebelum.



Gambar 7. Diagram alur penelitian

### 3. Prosedur Pembuatan Preparat

#### a. *Fixation*

- 1) Setelah mengambil serebelum, kemudian segera difiksasi dengan larutan pengawet berupa: Buffer formalin atau 10% formalin.

Perbandingan antara volume spesimen dengan larutan 1:10 untuk mendapatkan hasil yang baik.

b. *Trimming*

- 1) Setelah minimal 24 jam difiksasi, spesimen diambil dan dipotong menjadi 2.
- 2) Masukkan semua spesimen ke dalam larutan fiksasi dan biarkan selama minimal 24 jam.
- 3) Potong jaringan setebal 2-4 cm.
- 4) Masukkan potongan-potongan jaringan ke dalam "embedding cassette". Dalam satu *embedding cassette* dapat diisi 1-5 buah potongan jaringan disesuaikan dengan ukuran dari besar kecilnya potongan.

c. *Dehydration*

- 1) Berturut-turut dilakukan perlakuan sebagai berikut:
- 2) Berikan alkohol 80% selama 2 jam, lalu alkohol 90% selama 2 jam, alkohol 95% selama 1 jam, alkohol absolut I selama 1 jam, alkohol absolut II selama 1 jam, alkohol absolut III selama 1 jam.

d. *Clearing*

- 1) Berturut-turut dilakukan perlakuan sebagai berikut:
- 2) Berikan larutan Xylol I selama 1 jam, Xylol II selama 1 jam, Xylol III selama 1 jam.

e. *Impregnasi*

- 1) Berturut-turut dilakukan perlakuan sebagai berikut:
- 2) Berikan larutan Paraffin I selama 2 jam, Paraffin II selama 2 jam, Paraffin III selama 2 jam.

f. *Embedding*

- 1) Bersihkan sisa-sisa paraffin yang ada pada "pan" dengan memanaskan beberapa saat diatas api dan usap dengan kapas.
- 2) Siapkan parafin cair dengan memasukkan paraffin kedalam cangkir logam dan dimasukkan dalam oven dengan suhu diatas 58<sup>0</sup>C.
- 3) Tuangkan paraffin cair kedalam "pan".
- 4) Pindahkan jaringan satu persatu dari "embedding cassette" ke dasar "pan" dengan mengatur jarak satu dengan lainnya.
- 5) Masukkan/apungkan "pan" ke dalam air.
- 6) Lepaskan paraffin yang berisi jaringan tersebut dari "pan" dengan memasukkan ke dalam oven dengan suhu 4-6<sup>0</sup>C beberapa saat.
- 7) Potong-potong paraffin sesuai dengan letak jaringan yang ada dengan menggunakan skalpel/pisau hangat.
- 8) Letakkan pada balok kayu, ratakan pinggirnya dan buat ujungnya sedikit meruncing.
- 9) Blok paraffin siap dipotong dengan menggunakan mikrotom.

g. *Cutting*

- 1) Pemotongan dilakukan pada ruangan dingin.
- 2) Sebelum dipotong, blok terlebih dahulu didinginkan.

- 3) Lakukan pemotongan kasar dan dilanjutkan dengan pemotongan halus dengan ketebalan 4-5 mikron.
  - 4) Setelah pemotongan, pilih lembaran jaringan yang paling baik, apungkan pada air dan hilangkan kerutannya dengan cara menekan salah satu sisi lembaran jaringan tersebut dengan ujung jarum dan sisi yang lain ditarik menggunakan kuas runcing.
  - 5) Pindahkan lembaran jaringan tersebut kedalam *water bath* selama beberapa detik sampai mengembang sempurna.
  - 6) Dengan gerakan menyendok, ambil lembaran jaringan tersebut dengan *slide* bersih dan tempatkan ditegah atau pada sepertiga atas atau bawah, dicegah jangan sampai ada gelembung udara dibawah jaringan.
  - 7) Tempatkan *slide* yang berisi jaringan pada inkubator (suhu 37<sup>0</sup>C) selama 24 jam sampai jaringan melekat sempurna.
- h. *Staining* (Pewarnaan) dengan *Harris Hematoxylin Eosin*
- 1) Setelah jaringan melekat sempurna pada *slide*, dipilih yang terbaik, selanjutnya secara berurutan dimasukkan ke dalam zat kimia dibawah ini dengan waktu sebagai berikut:
  - 2) Xylol I selama 5 menit, Xylol II selama 5 menit, Xylol III selama 5 menit, Alkohol Absolut I selama 5 menit, Alkohol Absolut II selama 5 menit, Aquades selama 1 menit, *Harris Hematoxylin* selama 20 menit, Aquades selama 1 menit, *Acid* alkohol selama 2-3 celupan, Aquades selama 1 menit, Aquades selama 15 menit, *Eosin* selama 2 menit, Alkohol 96% I selama 2 menit, Alkohol 96% II

selama 3 menit, Alkohol Absolut III selama 3 menit, Alkohol Absolut IV selama 3 menit, Xylol IV selama 5 menit, Xylol V selama 5 menit.

i. *Mounting*

Setelah proses pewarnaan selesai, *slide* ditempatkan di atas tisu pada tempat yang datar, tetesi dengan bahan *mounting* yaitu *canada balsam* dan ditutup dengan *cover glass* cegah jangan sampai terbentuk gelembung udara.

j. Pembacaan *slide* dengan mikroskop. *Slide* diperiksa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x, dan 400x. Hasil: inti sel berwarna biru dan sitoplasma berwarna merah muda (Akoso *et al.*, 1999).

## **F. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel**

### **1. Identifikasi Variabel**

a. Variabel Independen

Variabel independen adalah dosis minuman beralkohol.

b. Variabel Dependen

Variabel dependen adalah jumlah sel Purkinje serebelum mencit.

## 2. Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Skala
Dosis minuman beralkohol	Dosis pada manusia yaitu sebanyak 1/2 botol besar (310 ml), pada mencit dosis tersebut dikonversi sehingga diberikan sebanyak 0,56 ml (dosis I), 0,80 ml (dosis II), 1,12 ml (dosis III). Dosis I adalah 1/1,41 kali dosis II, dan dosis III adalah 1,41 kali dari dosis II.	Numerik
Jumlah sel Purkinje serebelum mencit.	Jumlah sel Purkinje serebelum mencit dilihat dengan mengamati sediaan mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400x pada 5 lapang pandang.	Numerik

## G. Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data dengan menggunakan program SPSS versi 15.0 dengan uji *oneway* ANOVA, untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan jumlah sel Purkinje serebelum mencit antar kelompok, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc* LSD (*Least Significant Difference*). Kemudian dilakukan uji Pearson untuk mengetahui besar pengaruh pemberian minuman beralkohol terhadap jumlah sel Purkinje serebelum mencit.