

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental laboratorik (*true experiment*) dengan tipe *pretest-posttest control group design*. Penelitian dilakukan dengan menggunakan hewan coba mencit jantan galur Balb/c model diabetes melitus (diinduksi *alloxan*) yang diinduksi stres. Pengukuran tingkat stres menggunakan *anxiety-like behavior* (Zainuddin, 2011).

4.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain *stopwatch*, *elevated plus maze (EPM) test*, *light dark box (LDB)*, spuit injeksi 26G, alat sonde mencit, kandang mencit beserta tutup kandang, alat *footshock*, dan Easy Touch® *Blood Glucose Monitoring System*.

4.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian meliputi *alloxan monohydrate* (sigma aldrich), obat antidepresan *milnacipran hydrochloride* (ACE, Japan) golongan SNRIs, dapar sitrat *saline* pH 4,5 dan aquadest.

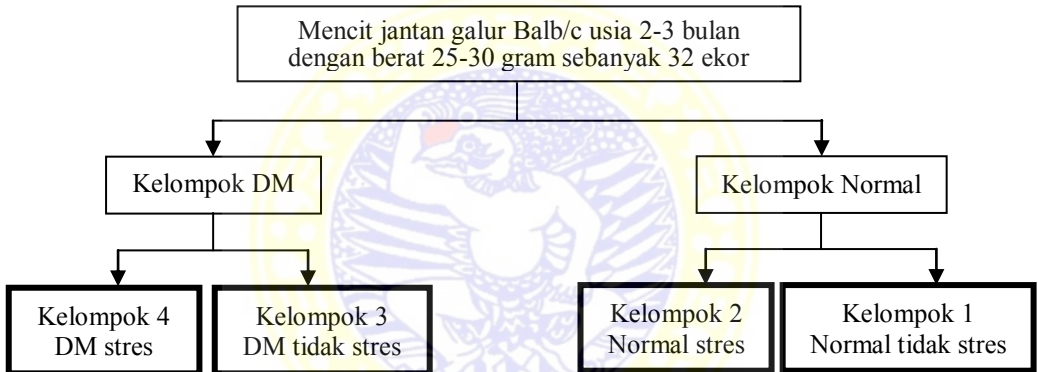
4.4 Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah hewan coba mencit jantan genus *Mus*, subfamily *Muridae*, ordo *Rodentia* spesies *Mus musculus* strain galur Balb/c usia 2-3 bulan berat 25-30 gram dengan

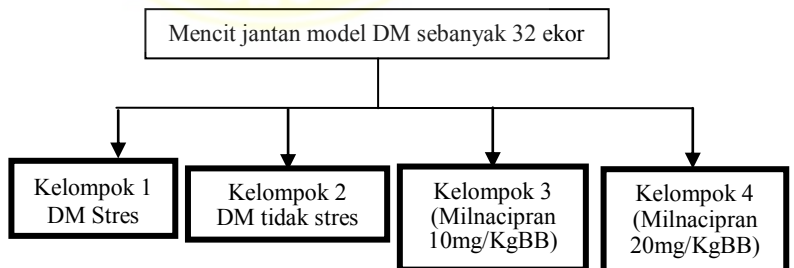
kondisi sehat, berperilaku normal, dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh.

Jumlah sampel menggunakan pendekatan empiris atau intuisional yaitu penentuan jumlah sampel yang digunakan pada penelitian sebelumnya. Penelitian sebelumnya menggunakan jumlah sampel 8-10 ekor mencit. Pada penelitian ini jumlah sampel tiap kelompok adalah 8 ekor mencit (Kamei *et al.*, 2003; Zainuddin, 2011).

4.4.1 Pengelompokan hewan coba

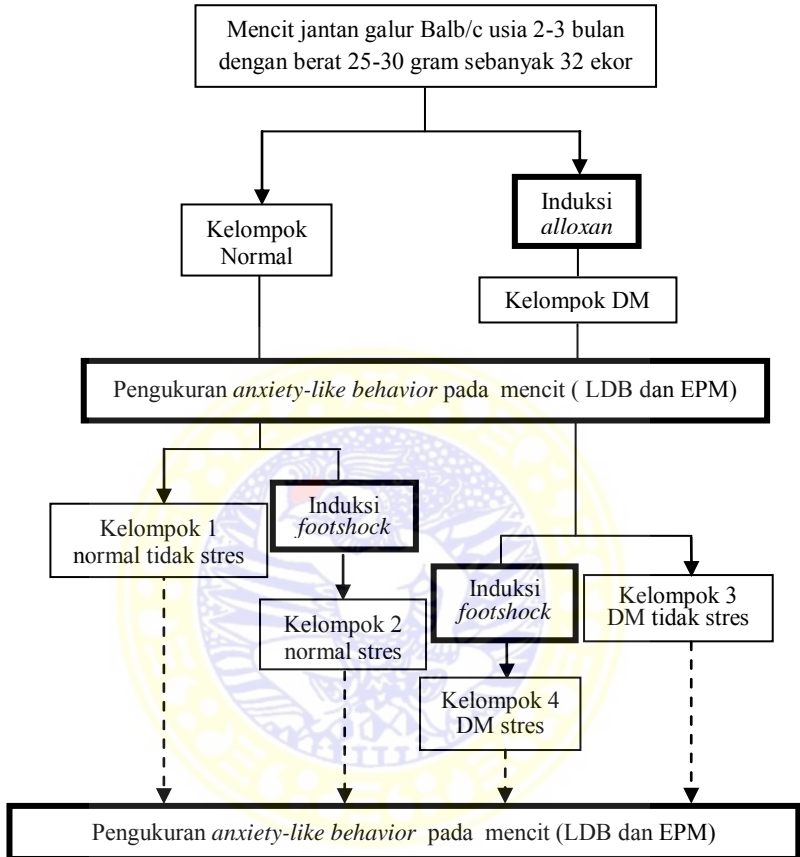


Gambar 4.1 Pengelompokan Hewan Coba Tahap 1

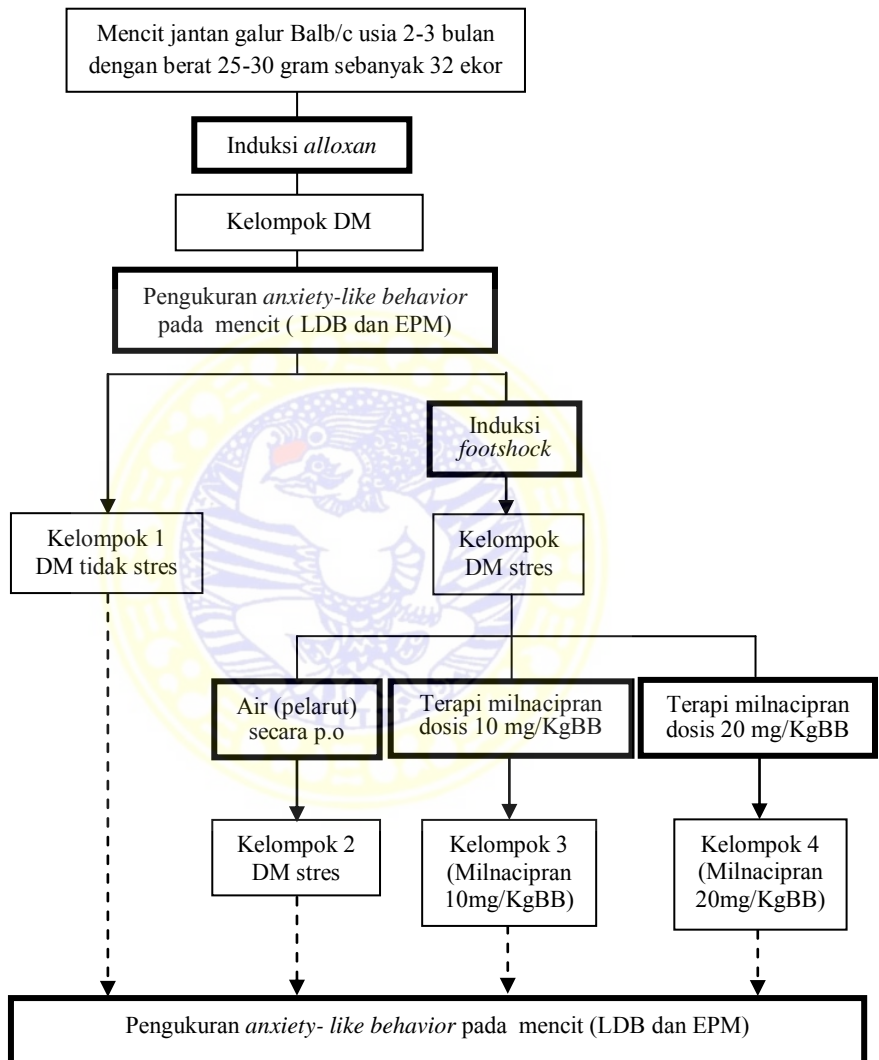


Gambar 4.2 Pengelompokan Hewan Coba Tahap 2

4.5 Kerangka Operasional



Gambar 4.3 Kerangka Operasional Tahap 1



Gambar 4.4 Kerangka Operasional Tahap 2

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan genus *Mus*, subfamily *Muridae*, ordo *Rodentia* spesies *Mus musculus* strain galur Balb/c usia 2-3 bulan berat 25-30 gram dengan kondisi sehat, berperilaku normal, dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh.

4.6.2 Induksi stres

Untuk menimbulkan stres mencit diinduksi dengan menggunakan *footshock*. Mencit dimasukkan dalam box ukuran 18x15 cm dengan diberi sekat pada tengahnya. Besar tegangan yang diberikan sebesar 0,6 mA 60 volt dengan durasi 10 detik sebanyak 15 kali. Induksi stres dilakukan selama 10 menit selama 14 hari atau lebih setiap hari.

4.6.3 Induksi *alloxan*

Hewan coba mencit yang diinginkan mengalami diabetes melitus diinjeksi secara intraperitoneal dengan *alloxan monohydrate* sebesar 140 mg/kg dalam dapar sitrat *saline* pH 4,5. Kadar glukosa darah akan meningkat pada 72 jam setelah diinduksi (Lenzen, 2008). Mencit dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dl dinyatakan diabetes melitus. Semua hewan coba mencit yang diinduksi *alloxan* akan mengalami polidipsi, polifagi dan poliuria (Hadcock *et al.*, 1991; Syiem *et al.*, 2002).

4.6.4 Antidepresan

Obat antidepresan yang digunakan adalah milnacipran golongan SNRIs. Terapi antidepresan digunakan untuk mengurangi stres akibat induksi *footshock* sehingga dapat meningkatkan rasio waktu mencit

dalam lengan bagian terbuka dan rasio frekuensi mencit masuk dalam lengan bagian terbuka EPM dan juga meningkatkan rasio lama waktu mencit dalam bagian terang.

4.6.5 Pengamatan terhadap perilaku cemas (*anxiety-like behavior*)

Pengukuran dilakukan pada mencit dengan menggunakan *Elevated Plus Maze (EPM)* dan *Light Dark Box (LDB)*. Pada pengamatan dengan EPM, tingkat kecemasan ditunjukkan dengan peningkatan waktu yang dihabiskan pada lengan tertutup dan peningkatan frekuensi mencit masuk dalam lengan tertutup. Pada pengamatan dengan LDB, kecemasan dianggap tinggi bila persentase waktu yang dibutuhkan di tempat terang lebih rendah (Rodgers dan Shepherd, 1993; Hascoet dan Bourin, 1998).

4.7 Protokol Penelitian

4.7.1 Rancangan penelitian

Penelitian eksperimen ini dilakukan pada 64 ekor mencit jantan galur Balb/c yang telah memenuhi syarat sebagai subyek penelitian. Mencit terbagi menjadi 8 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor.

4.8 Variabel Penelitian

4.8.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah tingkat stres hewan coba, terapi dan dosis milnacipran 10 mg/KgBB dan 20 mg/KgBB (Takeuchi *et al.*, 2010).

4.8.2 Variabel kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah hewan coba mencit dengan galur Balb/c jenis kelamin jantan, diet dan perawatan mencit, induksi diabetes melitus (*alloxan*), induksi stres (*footshock*).

4.8.3 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini meliputi penilaian perilaku cemas (*anxiety-like behavior*) yaitu skor pada EPM, dan LDB.

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Penanganan hewan coba

Menggunakan hewan coba mencit jantan genus *Mus*, subfamily Muridae, ordo Rodentia spesies *Mus musculus* strain galur Balb/c usia 2-3 bulan berat 25-30 gram dengan kondisi sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh. Hewan coba mencit ditempatkan dalam kandang pada suhu kamar $24 \pm 1^{\circ}$ C dengan mencukupi kebutuhan makanan dan minuman. Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan selama 1 minggu.

4.9.2 Prosedur kerja

Pembuatan induksi stres

Diberikan induksi stres dengan menggunakan *footshock* kepada kelompok stres. Besar tegangan yang diberikan sebesar 0,6 mA 60 volt dengan durasi 10 detik *on*, 30 detik *off*. Induksi stres dilakukan selama 20 menit selama 15 hari.

Pembuatan induksi *alloxan*

Hewan coba mencit yang diinginkan mengalami diabetes melitus diinjeksi secara intraperitoneal (i.p) dengan *alloxan monohydrate* 150

mg/kg dalam *normal saline* 0,9% 50 mg/ml sedangkan kelompok normal hanya akan diinjeksi dengan *normal saline* 0,9%. Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-3 atau ke-5 setelah diinduksi (Hadcock *et al.*, 1991; Syiem *et al.*, 2002).

Pemberian terapi antidepresan

Digunakan antidepresan milnacipran dengan dosis 10 mg/KgBB dan dosis 20 mg/KgBB. Antidepresan dilarutkan dalam air dan diberikan secara peroral dengan volume 0,1 ml/10gBB. Pemberian dilakukan satu kali sehari selama 8 hari (Bourin *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2007).

Pengukuran perilaku cemas (*anxiety-like behavior*)

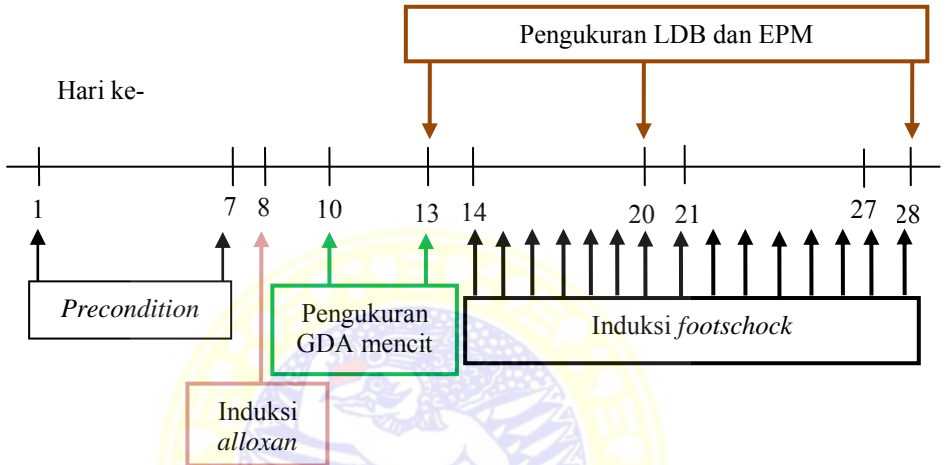
a. *Elevated Plus Maze* (EPM)

Pengukuran dilakukan pada mencit dengan memasukkan ke dalam *elevated plus maze* (EPM) yang terdiri dari 2 bagian terbuka (30x5cm) dan tertutup (30x5x15cm) dengan ketinggian 45 cm. Mencit diletakkan pada bagian tengah EPM antara bagian tertutup dan terbuka. Pengamatan dilakukan selama 5 menit dan dicatat waktu mencit berada dalam masing-masing bagian lengan menggunakan *stopwatch* dan frekuensi mencit masuk ke masing-masing lengan. Tingkat kecemasan ditunjukkan dengan peningkatan waktu yang dihabiskan pada lengan tertutup dan peningkatan frekuensi mencit masuk kedalam lengan tertutup dibandingkan dengan frekuensi mencit masuk dalam lengan terbuka. Pengamatan dilakukan pada hari ke-15, 21, dan 29 (Rodgers dan Shepherd, 1993; Rodgers dan Dalvi, 1997).

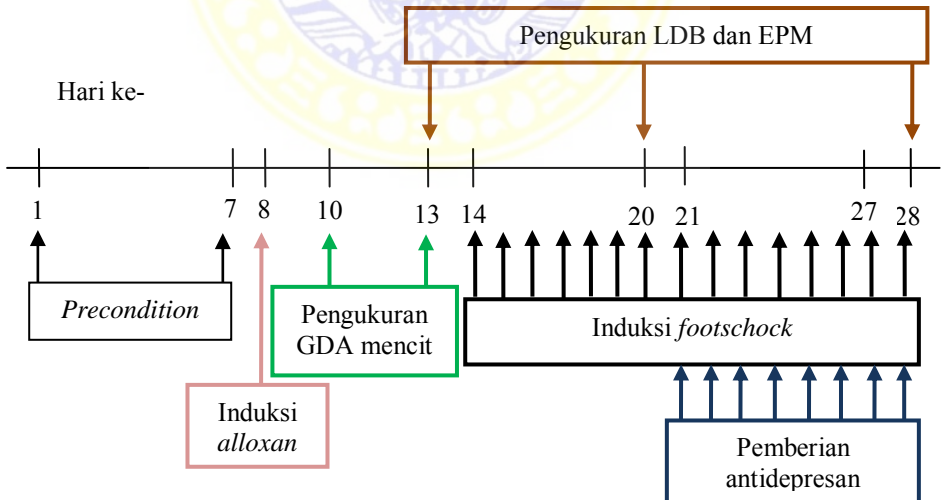
b. *Light Dark Box* (LDB) Test

Pada pengukuran tingkat kecemasan (*anxiety-like behavior*) dengan *light dark box test*, setiap mencit diletakkan pada *chamber polypropylene* dengan ukuran 46 x 27 x 30 cm³ yang terdiri dari bagian

gelap dan bagian terang. Pengamatan dilakukan selama 5 menit dan dicatat waktu yang dihabiskan mencit dalam masing-masing bagian dengan bantuan *stopwatch* (Hascoet dan Bourin, 1998).



Gambar 4.5 Pelaksanaan Penelitian Tahap 1



Gambar 4.6 Pelaksanaan Penelitian Tahap 2

4.10 Analisis Data

Analisis data dilakukan pada skor EPM dan skor LDB pada masing-masing kelompok. Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan *unpaired t-test*, *paired t-test* dan ANOVA *one-way post hoc tukey*.

