

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah ilmu farmakologi, histologi dan patologi anatomi.

3.2 Jenis dan rancangan penelitian

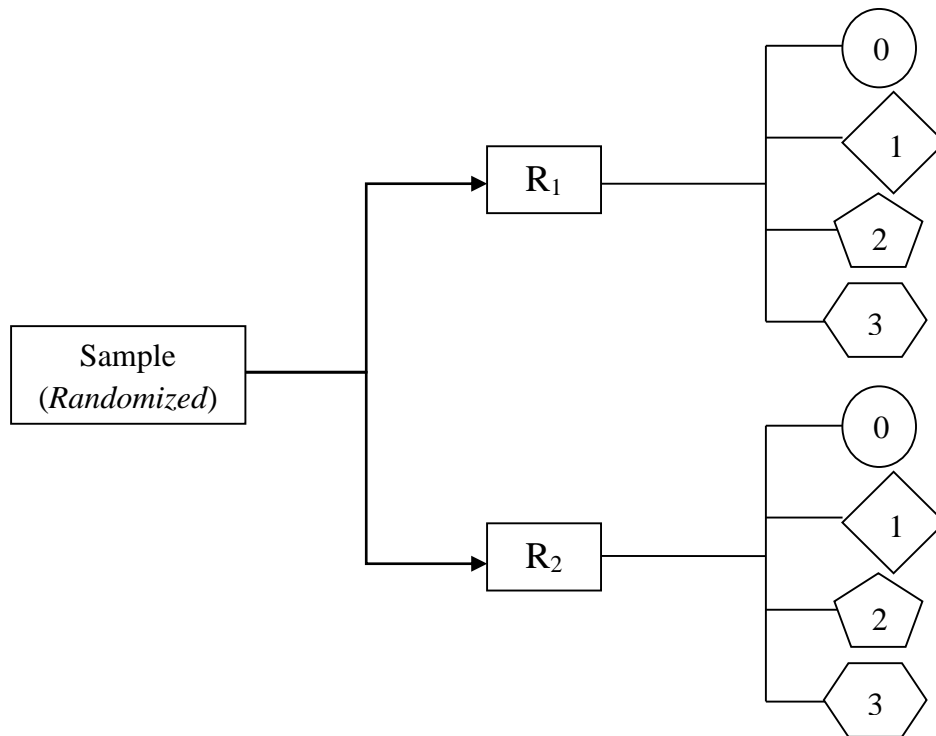
Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang menggunakan hewan coba tikus dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Terdapat 2 kelompok, kelompok pertama adalah kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diberi perlakuan, dan kelompok kedua adalah kelompok perlakuan yaitu kelompok yang dilakukan pemberian ketorolac tromethamine intraperitoneal dosis tunggal selama 5 hari pada tikus *Wistar* jantan yang telah mengalami frakturisasi tibia unilateral, dengan parameter pengukuran variabel terikat yaitu gambaran mikroskopis gaster dengan menggunakan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi.

3.3 Tempat dan waktu penelitian

1. Tempat pemeliharaan dan intervensi terhadap terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
2. Pembuatan preparat gaster hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi.

3. Pengamatan struktur mikroskopis gaster hewan coba dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Penelitian akan berlangsung selama 7 hari.



Gambar 4. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan

R_1 : Kelompok 1 / Kelompok Kontrol (Kelompok tikus yang telah dipilih secara random dari sampel berjumlah 10 ekor tikus, kemudian akan dilakukan pematangan tulang dan imobilisasi)

R_2 : Kelompok 2 / Kelompok Perlakuan (Kelompok tikus yang telah dipilih secara random dari sampel berjumlah 10 ekor tikus, kemudian akan dilakukan pematangan tulang dan imobilisasi) dan akan diberikan perlakuan berupa pemberian ketorolac tromethamine injeksi intraperitoneal dengan dosis 5 mg/kgBB selama 5 hari.

- 0 : Tingkat kerusakan gaster berdasarkan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi yaitu tidak ada perubahan patologis pada mukosa gaster tikus.
- 1 : Tingkat kerusakan gaster berdasarkan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi yaitu terjadi deskuamasi epitel mukosa gaster tikus.
- 2 : Tingkat kerusakan gaster berdasarkan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi yaitu terjadi erosi permukaan epitel mukosa gaster tikus.
- 3 : Tingkat kerusakan gaster berdasarkan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi yaitu terjadi ulserasi epitel mukosa gaster tikus.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus *Wistar* jantan dewasa berumur 8-10 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

3.4.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi.

3.4.2.1 Kriteria inklusi

- 1) Umur 8-10 minggu
- 2) Berat badan rata-rata 200-250 gram

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

Terdapat kecacatan anatomis

3.4.3 Cara sampling

Karena pada penelitian ini hanya terdapat 2 kelompok dan jumlah sampel yang digunakan berjumlah 20, maka 20 ekor tikus langsung dikelompokkan menjadi dua kelompok dimana kelompok kontrol berisi 10 ekor tikus *Wistar* yang tidak diberikan perlakuan dan kelompok perlakuan berisi 10 ekor tikus *Wistar* yang mendapat pemberian ketorolac tromethamine intraperitoneal 5 mg/kgBB selama 5 hari.

3.4.4 Besar sampel

Penentuan besar sampel minimal yang digunakan adalah menurut Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) dan World Health Organisation (WHO), yaitu 5 ekor tiap kelompok dengan prinsip 3R (Replacement, Reduction and Refinement), dan untuk mengantisipasi dikeluarkannya tikus akibat adanya kriteria drop out maka pada tiap kelompok ditambahkan 5 tikus. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 ekor tikus, dimana tiap kelompok masing-masing berisi 10 ekor tikus.

3.5 Variabel penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian injeksi ketorolac tromethamine intraperitoneal dengan dosis 5mg/kgBB.

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis gaster pada tikus.

3.6 Definisi operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
1	Ketorolac tromethamine	Ketorolac tromethamine adalah obat anti inflamasi non-steroid yang memiliki efek analgesik non-narkotik, antipiretik lemah, dan antiinflamasi. Ketorolac tromethamine yang digunakan adalah ketorolac tromethamine injeksi intraperitoneal karena secara bioavailabilitas sama baiknya dengan pemberian secara intravena dan lebih mudah dilakukan. Dosis yang digunakan adalah 5mg/kgBB. Pemberian dilakukan selama 5 hari pertama	Ya / Tidak (Ya berarti diberi injeksi ketorolac tromethamine intraperitoneal, Tidak berarti tidak diberi perlakuan)	Nominal
2	Gambaran histopatologi gaster tikus <i>Wistar</i> dewasa	Untuk memeriksa gambaran histopatologis gaster tikus <i>Wistar</i> dewasa pada penelitian ini diperoleh dengan cara membuat preparat gaster dengan menggunakan pengecatan Hematosilin Eosin (HE). Preparat tersebut diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x , diperiksa integritas mukosa. Tingkat kerusakan untuk satu tikus <i>Wistar</i> dewasa didapat dari rerata lima lapangan pandang. Terdapat empat kemungkinan gambaran histopatologis gaster tikus, yang pertama adalah gambaran normal tanpa perubahan histopatologis. Kedua adalah deskuamasi epitel yang berarti terjadi pelepasan elemen epitel. Ketiga adalah erosi permukaan epitel yang berarti terjadi hilangnya epitel usus pada fokus tertentu tanpa disertai hilangnya muskularis		Rasio

No	Variabel	Definisi operasional	Unit	Skala
		mukosa. Dan yang ke empat adalah ulserasi epitel yang berarti terjadinya luka terbuka pada mukosa gaster yang mungkin sulit untuk sembuh.		

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Bahan

Bahan-bahan untuk percobaan ini

- 1) Tikus *Wistar* jantan
- 2) Pakan standar hewan percobaan
- 3) Gypsum
- 4) Ketorolac tromethamine
- 5) Ketamine
- 6) Choloroform
- 7) Bahan-bahan untuk metode baku histologi pemeriksaan jaringan :
 - a) Larutan buffer formalin 10%
 - b) Hematoksilin Eosin
 - c) Larutan Xylol
 - d) Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%
 - e) Akuades

3.7.2 Alat

3.7.2.1 Alat untuk memberikan perlakuan

- a) Timbangan duduk dan timbangan neraca
- b) Kandang hewan coba
- c) Spuit tuberculin

3.7.2.2 Alat untuk otopsi

- a) Scalpel
- b) Pinset chirurgis
- c) Gunting operasi lurus tajam/tumpul
- d) Botol kaca untuk menyimpan organ

3.7.2.3 Alat untuk pemeriksaan histopatologis

- a) Mikroskop cahaya
- b) *Object glass* dan *deck glass*
- c) Kamera digital

3.7.3 Jenis data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer yang didapat langsung dari pemeriksaan mikroskopis gaster tikus *Wistar* dewasa menggunakan mikroskop cahaya medan terang.

3.7.4 Cara kerja

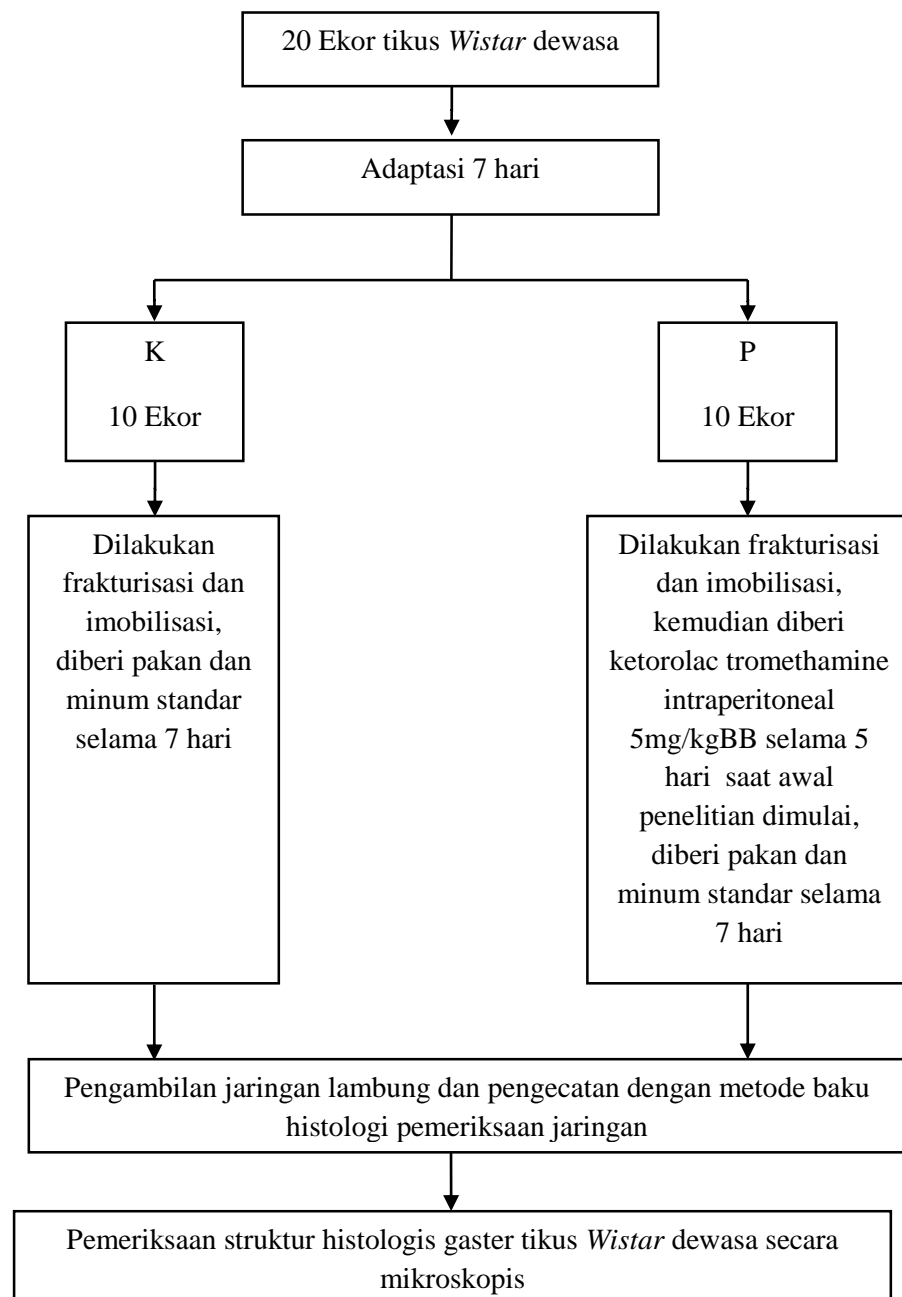
- a) Sampel (20 ekor tikus *Wistar*) diadaptasi dan diberi pakan dan minum standar selama 7 hari di laboratorium secara *ad libitum*.
- b) Dilakukan frakturisasi pada tibia kanan masing-masing tikus. Sebelum frakturisasi, semua tikus dianestesi dengan ketamine dosis 40mg/kgBB IM. Prosedur frakturisasi dilakukan secara tertutup, hal ini dilakukan dengan cara memberikan penekanan pada sisi luar kruris kanan tikus *Wistar* menggunakan kedua ibu jari hingga terdengar bunyi fraktur dan telah terjadi angulasi. Setelah frakturisasi, dilakukan immobilisasi dengan gips.

- c) Sampel dibagi menjadi 2 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 10 ekor tikus), yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.
- d) Kelompok kontrol hanya diberikan pakan standar dan minum selama 7 hari.
- e) Kelompok perlakuan akan diberikan injeksi ketorolac tromethamine intraperitoneal 5mg/kgBB dosis tunggal selama 5 hari awal dimulainya penelitian dengan waktu pemberian tiap siang hari tanpa memperhatikan kondisi gaster tikus terisi makanan atau tidak (waktu pemberian makan tidak dikontrol), serta pakan dan minum standar selama 7 hari.
- f) Pada hari ke-8 semua tikus akan diterminasi dengan cara pemberian choloroform inhalasi dosis sangat tinggi (*overdose*).
- g) Mengambil organ gaster dengan cara pembedahan. Sampel gaster tersebut selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet 10% dengan perbandingan 1 bagian gaster dan 9 bagian buffer formalin 10%
- h) Meletakkan tabung yang berisi sampel gaster tikus *Wistar* dewasa ke rak tabung, kemudian menyerahkan ke analis guna mengolahnya mengikuti metode baku histologi (lampiran 1). Dari setiap sampel gaster dibuat preparat dengan potongan transversal sehingga menjadi 3 potongan gaster, yang mewakili bagian fundus, corpus, dan pylorus. Akan diukur tingkat kerusakannya berdasarkan skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi. Tiap preparat dibaca dalam lima lapangan pandang secara acak dengan pembesaran 400x. Pembacaan preparat dari lima lapangan pandang dicari rerata skor untuk penilaian satu tikus *Wistar* dewasa.
- i) Perhitungan skor berdasarkan modifikasi *Barthel Manja* skor tingkat kerusakan yang diamati sebagai berikut:

Tabel 3. Skor *Barthel Manja* yang telah dimodifikasi

Skor	Integritas Epitel Mukosa
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel (1-10 sel epitel/lesi)
3	Ulserasi epitel (>10 sel epitel/lesi)

3.8 Alur penelitian



Gambar 5. Alur penelitian

3.9 Analisis data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 22.0 dan dilihat distribusi datanya normal atau tidak dengan uji *Shapiro-Wilk*. Dengan variabel dependen berskala rasio dan variabel independen berskala nominal, maka apabila distribusi datanya normal akan dilakukan uji beda statistik *Independent T-test*. Bila distribusi data tidak normal, maka akan dilakukan uji beda statistik *non-parametric Mann Whitney test*.

- a. Jika $p < 0,05$; maka ada perbedaan yang bermakna
- b. Jika $p > 0,05$; maka tidak ada perbedaan yang bermakna

Jika didapatkan hasil yang berbeda dan bermakna, maka ada perbedaan bermakna pada gambaran mikroskopik gaster tikus *Wistar* dewasa pada pemberian ketorolac tromethamine intraperitoneal dengan yang tidak mendapatkan ketorolac tromethamine.

Sebaliknya jika didapatkan hasil yang tidak bermakna, maka tidak ada perbedaan yang bermakna pada gambaran histopatologis gaster tikus *Wistar* dewasa pada pemberian ketorolac tromethamine intraperitoneal dengan yang tidak mendapat ketorolac tromethamine.

3.10 Etika penelitian

Ethical Clearance didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan keterangan No. 573/EC/FK-RSDK/2016. Tikus *Wistar* dewasa dipelihara di Laboratorium Farmakologi Universitas Wahid Hasyim Semarang .Seluruh yang berkaitan dengan penelitian ditanggung oleh peneliti.

