

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. Penelitian ini berjalan 2 tahap yaitu tahap pertama untuk menguji pengaruh suhu tubuh terhadap angka mortalitas tikus pasca BCCAO. Tahap kedua adalah untuk menguji pengaruh suhu tubuh terhadap volume iskemia otak tikus pasca BCCAO

3.3. Subyek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar yang memenuhi kriteri inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah tikus putih *rattus norvegicus*, dengan usia 3 bulan, berat badan 150-200 gram. Kriteria eksklusi adalah tikus yang tidak sehat atau cacat. Pada penelitian ini digunakan hewan coba dengan rincian seperti berikut:

1. Tahap I penelitian. Pada tahap 1 digunakan tikus yang terbagi menjadi 2 kelompok untuk induksi iskemia 5 menit dengan *reperfusion* 24 jam, dan kelompok induksi iskemia 10 menit dengan *reperfusion* 24 jam.
2. Tahap II penelitian. Pada tahap kedua digunakan tikus yang terbagi menjadi kelompok 1 perlakuan suhu optimal dengan durasi 5 menit, kelompok 2 perlakuan suhu non optimal dengan durasi 5 menit, kelompok 3 perlakuan suhu optimal dengan durasi 10 menit dan kelompok 4 perlakuan suhu non-optimal dengan durasi 10 menit.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas dari penelitian ini adalah suhu tubuh tikus pasca *transient* BCCAO, sedangkan variabel tergantung adalah volume iskemia otak dan angka mortalitas tikus

3.5. Definisi Operasional

- a. Angka mortalitas tikus adalah angka kematian masing-masing kelompok yang diamati setelah dilakukan *transient* BCCAO selama 5 dan 10 menit dengan *reperfusion* 24 jam .
- b. *Transien* BCCAO adalah pengikatan arteria carotis communis bilateral dengan klem arteri selama 5 dan 10 menit yang dilanjutkan dengan *reperfusion* 24 jam
- c. Suhu tubuh optimal adalah suhu tubuh hewan coba sebesar 36-37°C saat diinduksi iskemia
- d. Suhu tubuh non optimal adalah suhu tubuh hewan coba sebesar < 36°C saat diinduksi iskemia
- e. Volume iskemia otak adalah volume otak yang diukur pasca *transient* BCCAO menggunakan metode cavalieri

3.6 Instrumen Penelitian

Alat :

1. Kandang
2. Alat bedah minor
3. Benang *silk* 3-0
4. Benang *cutgut* 3-0
5. Termometer
6. Jarum suntik 1 cc
7. Isolasi
8. Alas operasi Hotplate
9. Lampu
10. Klem arteri

Bahan :

1. Kapas
2. Povidon iodin
3. Ketamin
4. Analgetik

3.7. Alur Penelitian

3.7.1 Persiapan hewan coba

Tikus berasal dari laboratorium penelitian FK UII. Tikus dipelihara dalam kandang berukuran 40cm x30cm x 20cm. Pakan tikus berupa pelet sedangkan minum berupa air putih yang diberikan secara *ad libitum*.

3.7.2 Tindakan transien BCCAO

- a) Tikus dibius menggunakan ketamin 1000 mg dengan dosis 0,2 cc/ tikus, teknik injeksi IM pada tungkai atas tikus.
- b) Tikus diletakkan di atas alas operasi pada *hotplate* dengan fiksasi secukupnya.
- c) Suhu tubuh tikus diatur menggunakan *hotplate*
- d) Suhu tikus diukur dengan termometer.
- e) Daerah leher tikus disterilkan menggunakan povidon iodin.
- f) Kulit leher bagian medial tikus diinsisi dengan menggunakan gunting.
- g) Arteria carotis communis tikus dieksplorasi menggunakan teknik tumpul.
- h) Arteria carotis communis bilateral diklem menggunakan klem pembuluh darah selama 5 dan 10 menit.
- i) Klem pembuluh darah dilepas setelah 5 dan 10 menit, luka dijahit, tikus diletakkan kembali di kandang
- j) Jumlah tikus yang mati dan hidup dalam 24 jam diamati.

3.7.3. Dekapitasi Tikus dan Pengambilan Otak

Eutanasia dilakukan setelah 24 jam dari ligasi transien arteri carotis comunis bilateral , dengan cara mengeluarkan darah sampai habis dengan teknik

perfusi transkardial. Sebelumnya tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80-100 mg/kgBB im. Setelah tikus masuk dalam fase anestesi dalam maka dilakukan insisi linea mediana pada dinding abdomen, dilanjutkan insisi sepanjang linea axilaris sampai dinding thoraks terbuka dan jantung terlihat. Ventrikel kiri jantung diinsisi kemudian kanula dimasukkan sampai mencapai aorta ascenden. Kanula difiksasi dengan penjepit arteri. Dilakukan insisi atrium kanan untuk mengeluarkan darah. Cairan perfusi NaCl dialirkan melalui kanula. Agar otak mendapatkan perfusi sepenuhnya maka dilakukan jepitan pada aorta decendens. Perfusi dilanjutkan sampai darah yang keluar melalui atrium kanan tampak jernih dan arteri mamaria interna di sekitar sternum tampak putih karena terisi cairan jernih. Setelah perfusi transkardial sempurna maka dilakukan dekapitasi, kemudian jaringan otak diambil dan dilakukan pewarnaan TTC. Sebelum dilakukan pewarnaan TTC maka dilakukan trimming pada otak tikus dengan ketebalan 2 mm. Selanjutnya dilakukan pewarnaan TTC.

3.7.4 Pewarnaan TTC dan Pengukuran Volume Iskemia Otak

Daerah iskemik pada otak akan kurang terwarnai oleh TTC, sedangkan daerah non iskemik tampak berwarna merah. Analisis volume iskemik pada masing-masing kelompok menggunakan Prinsip Stereologi dengan metode Cavalieri. Hasil volume iskemik dinyatakan dalam satuan mm³.

Foto pewarnaan TTC diamati menggunakan *Software Microsoft Word* dengan grid berupa titik. Ketebalan irisan otak (t) adalah 2 mm. Jarak antara titik grid adalah 2 mm. Luas area yang diwakili oleh satu titik (a/p) adalah hasil perkalian 2 mm x 2 mm sehingga didapatkan nilai a/p sebesar 4 mm². Jumlah titik yang jatuh pada area iskemik dinyatakan dalam $\sum P$. Volume Iskemia Otak masing-masing sampel diukur menggunakan rumus yaitu $V=t.(a/p). \sum P$.



Gambar 3. Grid Titik

3.8 Analisis Data

Dilakukan uji normalitas dan homogen, jika normal maka rerata hewan yang mati pada masing masing kelompok akan diuji menggunakan uji kai kuadrat dan rerata volume iskemia otak pada masing masing kelompok diuji dengan uji ANOVO *one way* dan dilanjutkan *post hoc*.

3.9 Etika Penelitian

- a) Sebelum melaksanakan prosedur penelitian eksperimental ini di laboratorium terlebih dahulu mengajukan *ethical clearance*
- b) Meminta izin kepada Kepala Bagian Laboratorium tersebut, yaitu Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia