

## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental quasi dengan menggunakan rancangan penelitian *post test control group design*.

### 3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian yaitu tikus jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang dikembangkan oleh FK UII yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusi subyek penelitian ini yaitu tikus jantan yang sehat dan tidak cacat, berumur 3 bulan dengan berat badan 100-150gram. Penentuan tikus sehat berdasarkan keadaan fisik tikus yaitu kondisi bulu yang bersih, tidak basah atau lengket, tikus aktif bergerak, makan, minum dan tidur sesuai siklus hidupnya. Kriteria eksklusi subyek penelitian ini yaitu tikus yang sakit dan mati selama perjalanan penelitian.

Penentuan besar sampel dengan teknik *simple random sampling* dan perhitungannya menggunakan metode *resource equation*.

$$\begin{aligned} E &= \text{Total Jumlah Hewan} - \text{Total Jumlah Kelompok} \\ 10-20 &= \text{Total Jumlah Hewan} - 4 \\ \text{Total Jumlah Hewan} &= (10-20) + 4 \\ &= 14-24/4 \text{ kelompok} \\ &= 3-6 \text{ ekor/kelompok} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, untuk mengetahui jumlah sampel tikus yang dipakai dengan mempertimbangkan angka kejadian kematian tikus, maka jumlah sampel dihitung lagi dengan *corrected sample size* sebagai berikut,

$$\begin{aligned} \text{Corrected sample size} &= \text{Sample size} / [1-(\% \text{kematian}/100)] \\ &= 3-6 / [1-(20\%/100)] \\ &= 4-7 \text{ ekor tikus.} \end{aligned}$$

Jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah 4-7 ekor tikus, dengan jumlah perlakuan sebanyak 4 kali maka total tikus adalah 16-28 ekor tikus. Adapun gambaran kelompok adalah sebagai berikut :

1. Kelompok Sk yaitu *sham operated 1* (operasi yang sama tanpa ligasi arteri karotis komunis bilateral) dengan anastesi ketamin
2. Kelompok Skx yaitu *sham operated 2* (operasi yang sama tanpa ligasi arteri karotis komunis bilateral) dengan anastesi ketamin-xylazine
3. Kelompok Pk yaitu perlakuan 1 (*rat stroke model BCCAO*) dengan anastesi ketamin
4. Kelompok Pkx yaitu perlakuan 2 (*rat stroke model BCCAO*) dengan anastesi ketamin-xylazine

### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini berlangsung selama enam bulan dengan tempat penelitian di Laboratorium Fisiologi FK UII dan Laboratorium Riset FK UII.

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah volume iskemia pada otak tikus (*Rattus norvegicus*) dengan ligasi BCCAO

#### **3.4.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ketamin dan kombinasi ketamin-xylazin.

### **3.5 Definisi Operasional**

1. Ligasi arteri carotis comunis bilateral (BCCAO) adalah pengikatan arteri carotis communis bilateral secara transien atau sementara
2. Durasi BCCAO adalah lamanya waktu perlakuan BCCAO, dalam hal ini dilakukan selama 20 menit.

3. Reperfusi adalah suatu kondisi dimana kembalinya aliran darah menuju jaringan setelah terjadi periode iskemia atau penurunan oksigen jaringan.
4. Periode reperfusi adalah lamanya waktu terjadinya reperfusi. Periode reperfusi ditentukan oleh peneliti. Pada penelitian ini periode reperfusi yang digunakan adalah 7 hari
5. Ketamin dosis 75 mg/kgBB yang diberikan secara intramuskular (IM)
6. Ketamin-xylazine. Ketamin dosis 75 mg/KgBB (Alfamine 10%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands), dan xylazine dosis 8 mg/KgBB (Alfazyne 2%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands) i.m.
7. Volume iskemia otak tikus adalah kondisi iskemia pada otak tikus pasca BCCAO dan reperfusi yang digambarkan dengan warna putih pada pewarnaan TTC.

### **3.6 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.6.1 Alat penelitian**

- a. kandang untuk pengelompokan tikus
- b. alat bedah minor
- c. benang silk untuk ligasi
- d. sterilisator ruangan dan peralatan
- e. perfusi trankardial
- f. alat trimming otak

#### **3.6.2 Bahan penelitian**

- a. Tikus jantan (*rattus norvegicus*) galur Wistar berumur 3 bulan didapatkan dari FK UII
- b. Ketamin

- c. Ketamin-xylazine
- d. bahan perfusi transkardial
- e. Obat analgetik
- f. Bahan desinfeksi
- g. Pakan
- h. Akuades

### **3.7 Alur Penelitian**

#### **3.7.1 Persiapan hewan coba**

Pada hari ke-1 sampai hari ke-7, hewan coba adapatasi di kandang. Satu kandang diisi oleh 1 tikus. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan siklus terang gelap selama 12 jam. Siklus terang dimulai pukul 06.00 WIB dan siklus gelap dimulai pukul 18.00 WIB. Pelet diberikan setiap hari pada pagi hari pukul 06.00 WIB. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

#### **3.7.2 Ligasi arteri carotis comunis bilateral**

Ligasi arteri dilakukan pada hari ke-8. Tahapan ligasi adalah sebagai berikut :

1. Tahap anastesi. Selama operasi tikus dianastesi menggunakan ketamin dosis 75 mg/kgBB im. Tikus diletakkan di platform steril dan jaga suhu rectal tikus pada temperatur  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
2. Tahap desinfeksi. Tahap ini bertujuan untuk mencegah infeksi. Desinfeksi menggunakan alkohol dan larutan betadin di permukaan leher anterior tikus.
3. Tahap insisi. Insisi dilakukan secara vertikal pada bagian median leher anterior.
4. Tahap eksplorasi arteri karotis komunis. Eksplorasi leher anterior tanpa memotong glandula submandibularis dan nervus phrenicus.

5. Tahap Ligasi. Setelah arteri karotis komunis tampak maka dilakukan ligasi arteri karotis komunis dengan menggunakan benang silk secara permanen.
6. Setelah ligasi selesai maka diberikan terapi analgetik yaitu bupivacain 0,25% dosis 0,1 mL lokal, frekuensi pemberian satu kali/hari (analgetik yang dianjurkan untuk *rat stroke model*). Bekas insisi dijahit kembali dengan menggunakan benang silk. Daerah disekitar insisi didisinfeksi menggunakan betadin.

### **3.7.3 Perlakuan Pada Kelompok Sham Operated**

Pada hari ke-8, Kelompok sham mendapatkan perlakuan operasi yang sama dengan kelompok kontrol dan perlakuan tanpa dilakukan ligasi arteri karotis komunis bilateral.

### **3.7.4 Eutanasia dan Pengambilan otak**

Eutanasia dilakukan pada hari ke-11, dengan cara mengeluarkan darah sampai habis dengan teknik perfusi transkardial. Sebelumnya tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 75 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 saline dialirkan melalui kanula. Agar otak mendapatkan perfusi sepenuhnya maka dilakukan jepitan pada aorta decendens. Perfusi saline 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.

### 3.7.5 Pewarnaan TTC

Sebelum dilakukan pewarnaan TTC maka dilakukan trimming pada otak tikus dengan ketebalan 2 mm. Selanjutnya dimasukkan larutan TTC dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit lalu dilakukan pengambilan foto preparat. Kemudian otak tikus dimasukkan dalam cairan formalin untuk penyimpanan. Pada hari berikutnya dilakukan kembali pengambilan foto setelah didamkan selama 1 malam, kemudian larutan formalin diganti dengan larutan alkohol sebagai media penyimpanan otak tikus.

### 3.7.6 Perhitungan volume iskemik otak

Perhitungan volume iskemik otak (V) dilakukan menggunakan prinsip stereologi dengan metode Cavalieri. Hasil volume otak dinyatakan dalam satuan mm<sup>3</sup>. Foto pewarnaan TTC diamati menggunakan *software Microsoft Word* dengan grid berupa titik. Ketebalan irisan otak dinyatakan dalam (t) dengan nilai tetap sebesar 2 mm, dan jarak antar grid 2mm. Luas area yang diwakili oleh satu titik dinyatakan dalam (a/p) merupakan suatu area yang berbentuk persegi dengan ukuran tiap persegi adalah 2x2mm sehingga nilai (a/p) adalah 4 mm<sup>2</sup>. Jumlah titik yang jatuh pada area iskemik dinyatakan dalam  $\Sigma P$ . Volume otak masing-masing sampel diukur menggunakan rumus  $V = t(a/p) \cdot \Sigma P$ .

### 3.8 Analisis Data

Analisis data diawali dengan uji normalitas dengan menggunakan *Shapiro-Wilk Test*. Apabila  $p > 0,05$  data tersebut memiliki distribusi normal, dilanjutkan menggunakan uji *One Way Anova* kemudian *Post Hoc Bonferroni* apabila varian sama dan *Post Hoc Tamhane's* apabila varian berbeda. Sedangkan jika  $p < 0,05$  maka dikatakan data tersebut distribusinya tidak normal dan dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dilanjutkan *Man Whitney Test*. Semua uji yang dilakukan memiliki *Confident Interfal (CI)* sebesar 95% ( $\alpha = 0,5$ ).

### 3.9 Etika Penelitian

Nomor *ethical clearance* Nomor 53/Ka.Kom.Et/70/KE/IV/2019.