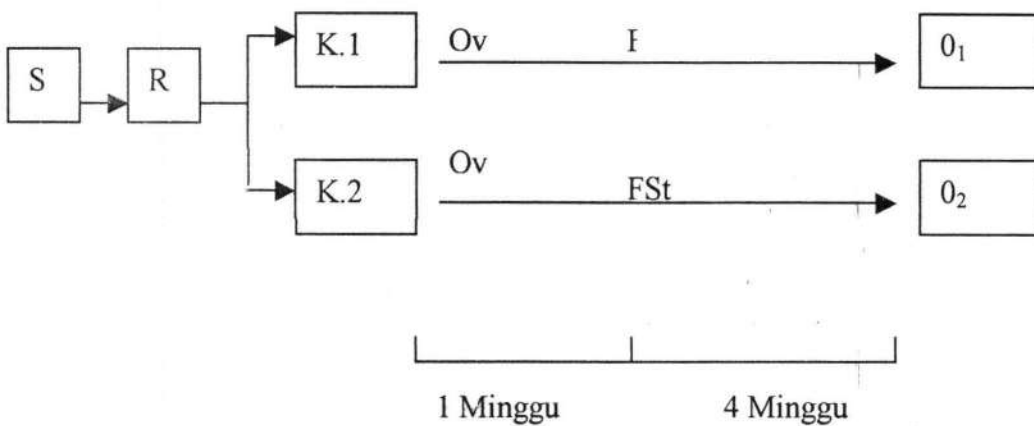


BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

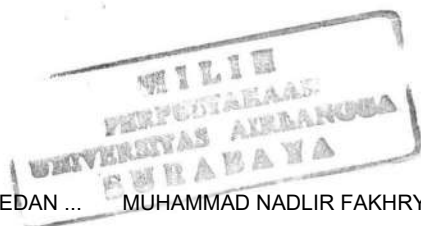
Untuk memecahkan masalah penelitian digunakan studi eksperimental dengan *the post test only control group design*. Rancangan tersebut dipilih berdasarkan asumsi bahwa dalam suatu populasi tertentu tiap unit populasi adalah homogen, yaitu semua karakteristik antar unit populasi adalah sama, maka tidak dilakukan pengukuran awal tetapi hanya dilakukan pengukuran akhir saja (Dewi, 2001).



Keterangan :

S = Sampel kelompok awal

R = Randomisasi



K1= Kelompok 1 yang akan diberi perlakuan ovariektomi & patah tulang dan tanpa diberi stimulasi medan elektromagnetik

K2= Kelompok 2 yang akan diberi perlakuan ovariektomi & patah tulang dan diberi stimulasi medan elektromagnetik

Ov= Ovariektomi

F= Patah tulang Tibia pada $\frac{1}{3}$ bagian tengah 1 minggu setelah ovariektomi

St = Pemberian stimulasi medan elektromagnetik segera setelah patah tulang

O₁, O₂ = Merupakan observasi dari masing – masing kelompok, kemudian dilakukan perhitungan jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , jumlah osteoblas, dan tebal kalus

4.2 Populasi, Sampel, Teknik Pengambilan Sampel dan Besar Sampel

Populasi sampel penelitian adalah tikus putih yang berasal dari Bagian Biokimia FK.Unair Surabaya.

Sampel masing-masing kelompok diambil secara random dan memenuhi persyaratan :

1. *Rattus norvegicus* galur Wistar
2. Umur 2-2,5 bulan dengan berat badan sekitar 200g
3. Jenis kelamin betina dan tidak bunting
4. Sehat, ditandai gerakan yang aktif

Besar sampel ditentukan berdasarkan rumus

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times \sigma D^2}{\delta^2}$$

dimana $\delta/\sigma = 1$, sehingga $(\sigma D)^2 / \delta^2 = 1$, dan $Z_{\alpha} = Z_{0,05} = 1,65$ untuk $\alpha = 0.05$ satu arah serta $Z_{\beta} = Z_{0,20} = 0,85$; maka didapatkan besar sampel ~ 8 (Steel, 1981).

Pada penelitian ini diambil besar sampel sebesar 10 untuk tiap kelompok untuk mengantisipasi kematian pada hewan coba saat perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

a. Variabel Bebas

Pemberian stimulasi medan elektromagnetik

b. Variabel tergantung

1. Jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β
2. Jumlah osteoblas
3. Tebal kalus

c. Variabel kendali

1. Jenis hewan coba
2. Jenis kelamin hewan coba
3. Kesehatan fisik hewan coba
4. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba
5. Waktu perlakuan

6. Umur hewan coba.

d. Variabel Moderator

Berat badan hewan coba

4.3.2 Definisi operasional variabel

a. Pemberian stimulasi medan elektromagnetik

Pemberian Stimulasi medan elektromagnetik pada tulang tibia dilakukan segera sesudah frakturisasi dilakukan hingga hewan dikorbankan pada minggu ke-4. Pemberian stimulasi medan elektromagnetik berupa pemberian stimulasi dengan alat produksi Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) dengan frekwensi 60 Hz dengan kekuatan medan magnet 1 Gauss selama 6 jam setiap hari pada seluruh tubuh tikus (Brighton, 2003).

b. Jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β

Jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β adalah rerata jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β pada jaringan kalus dalam lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400x dan dengan menggunakan metode imunohistokimia, dengan satuan jumlah per lapang pandang.

c. Jumlah osteoblas

Jumlah sel osteoblas adalah rerata jumlah sel osteoblas pada jaringan kalus yang dihitung dalam lima lapangan pandang mikroskop dengan pembesaran 400x dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE), dengan satua jumlah per lapang pandang.

d. Tebal kalus

Kalus adalah jaringan penyembuhan patah tulang. Pembentukan kalus diamati selama 4 minggu berupa jaringan fibrosis, kartilago dan *woven bone* (Hatano et al, 2001^{cit} Kalfas,2001 ^{cit} Rockwood,1996). Tebal kalus diukur pada jaringan histologis tulang dengan graticule pada mikroskop dengan dengan pembesaran 100x, dengan satuan mikron.

4.4 Jenis hewan coba

Jenis hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar dari tempat penangkaran.

4.4.1 Jenis kelamin hewan coba

Jenis kelamin hewan coba adalah betina.

4.4.2 Umur

Umur hewan coba adalah antara 2-2,5 bulan

4.4.3 Berat

Berat badan hewan coba adalah sekitar 200 gram yang diukur dengan timbangan torbal (*Torsion Balance*), dalam satuan gram dengan ketelitian satu angka dibelakang koma.

4.4.4 Waktu perlakuan

Waktu perlakuan 4 minggu berdasar proses pembentukan kalus tulang pasca frakturisasi (Hatano et al, 2001^{cit} Kalfas,2001 ^{cit} Rockwood,1996)

4.4.5 Kesehatan fisik hewan coba

Ditandai dengan gerakan aktif hewan coba, bulu tidak kusam, berat badan tidak turun lebih dari 10% selama aklimatisasi (selama 7 hari di Biokimia FK Unair) dan berespon terhadap rangsangan di sekeliling. Berat badan diukur

dengan timbangan Torbal dalam satuan gram dengan ketelitian satu angka dibelakang koma.

4.4.6 Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

Dilakukan dalam kandang ukuran 30x40x15 cm yang masing-masing berisi 5 ekor hewan coba. Kandang terbuat dari plastik yang ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Setiap 2 hari sekali sekam diganti untuk menjaga kebersihan kandang. Makanan yang digunakan adalah makanan hewan jenis BR-2 produksi PT Comfeed dan diberi minum Aqua (Smith, Mangkoewidjojo, 1988).

4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan penelitian

a. Hewan coba

Hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar, jenis kelamin betina, umur 2-2,5 bulan, berat sekitar 200 gram, dalam kondisi sehat fisik.

b. Bahan untuk perlakuan

Alat Stimulasi medan elektromagnetik menggunakan mesin medan elektromagnetik yang diproduksi oleh ITS dengan spesifikasi frekwensi 60 Hz dengan kekuatan medan magnet 1 Gauss

c. Bahan pemeriksaan

1. Ether Anaestheticum
2. Kapas dan kasa
3. Kertas label.
4. Povidone Iodine 10%

d. Instrumen penelitian

- 1 Kandang ukuran 30 x 40 x 15 cm
- 2 Timbangan Torbal
- 3 Graticule
- 4 Alat Injeksi untuk pembiusan
- 5 Sonde
- 6 Gunting dan pisau bedah
- 7 Benang katun.

e. Prosedur penelitian**1. Aklimatisasi**

Aklimatisasi hewan coba selama tujuh hari dalam kondisi laboratorium.

2. Pembagian kelompok hewan coba

Dilakukan randomisasi 20 ekor tikus, dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing terdiri dari 10 ekor, yaitu :

Kelompok 1 = Tikus percobaan dengan perlakuan ovariectomi dan frakturisasi 1 minggu sesudahnya dan diterminasi dalam waktu 4 minggu.

Kelompok 2 = Tikus percobaan dengan perlakuan ovariectomi dan frakturisasi 1 minggu sesudah ovariectomi. Pemberian stimulasi medan elektromagnetik dilakukan segera sesudah frakturisasi dilakukan hingga hewan diterminasi pada minggu ke-4. Pemberian stimulasi medan elektromagnetik berupa pemberian stimulasi dengan alat dengan frekwensi 60 Hz dengan kekuatan medan magnet 1 Gauss selama 6 jam setiap hari pada tempat patah tulang tibia yang telah dibuat dan di terminasi dalam waktu 4 minggu. (Brighton CT, 2003)

3. Penimbangan berat badan sebelum perlakuan

Penimbangan dilakukan pada pagi hari sebelum perlakuan yang pertama kali dengan menggunakan timbangan Torbal[®] (*Torsion Balance*) dengan satuan gram dan dengan ketelitian satu angka di belakang koma.

4. Pelaksanaan perlakuan

Kelompok 1 = Tikus percobaan dengan perlakuan ovariektomi dan frakturisasi 1 minggu sesudahnya dan diterminasi dalam waktu 4 minggu.

Kelompok 2 = Tikus percobaan dengan perlakuan ovariektomi dan frakturisasi 1 minggu sesudah ovariektomi. Ovariektomi disini dilakukan dengan pengambilan kedua ovarium dan ligasi kedua oviduknya melalui insisi di punggung hewan coba dan dikontrol dengan hapusan vaginal hewan coba. Rincian teknik ovariektomi akan dicantumkan pada lampiran 1. Jarak waktu antara ovariektomi dengan frakturisasi agar mendapatkan keadaan seperti pascamenopause adalah 1 minggu sesuai dengan kontrol hapusan vaginal tikus pascaovariektomi (Hatano et al, 2001*cit* May,1971). Patah tulang dilakukan pada tulang tibia kanan sepertiga tengah ekstremitas hewan coba. Jenis patah tulang adalah patah tulang transversal pada diafisis tulang tibia secara terbuka dan difiksasi menggunakan *plaster cast of Paris* dengan cara yang dirinci pada bab lampiran 4. Pemberian Stimulasi medan elektromagnetik dilakukan segera sesudah patah tulang dilakukan hingga hewan diterminasi pada minggu ke-4. Pemberian stimulasi medan elektromagnetik berupa pemberian stimulasi dengan alat dengan frekwensi 60 Hz dengan kekuatan medan magnet 1 gauss selama 6 jam setiap hari pada tempat patah tulang tibia yang telah dibuat dan di terminasi dalam waktu 4 minggu.(Brighton ,

2003). Jaringan kalus pada tulang Tibia didapatkan setelah hewan coba dikorbankan dengan cara penyuntikan pentobarbital dengan dosis 100 mg/kg intraperitoneal (Smith et al,1988). Pengukuran dilakukan setelah preparat tulang tibia dibersihkan dari semua otot dan tendon yang melekat dan difiksasi dengan formalin 10% untuk kemudian dibuat preparat sediaan histologis sesuai cara yang tercantum pada lampiran 4.

5. Pengukuran jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β

Pengukuran dilakukan dengan membuat preparat histologi pada jaringan kalus, kemudian dibawa ke laboratorium GRAMIK FK Unair untuk kemudian dilakukan pemeriksaan secara imunohistokimia. Antibodi primer yang digunakan adalah TGF- β . Jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β adalah rerata jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β pada jaringan kalus pada lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400x.

6. Pengukuran jumlah osteoblas

Preparat histologi pada jaringan kalus yang telah diberi pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan dihitung rerata jumlah osteoblas pada lima lapang pandang

7. Pengukuran tebal kalus

Pengukuran dan tebal kalus tulang dilakukan pada preparat histologis tulang secara longitudinal dengan menggunakan graticule. Preparat histologis tulang dan graticule diamati dengan pembesaran 100x. Pengukuran dilakukan setelah preparat tulang tibia dibersihkan dari semua otot dan tendon yang melekat dan difiksasi dengan formalin 10% untuk

kemudian dibuat preparat sediaan histologis sesuai cara yang tercantum pada lampiran 4.

4.6 Waktu dan Tempat Perlakuan

Tempat perlakuan adalah di Bagian Farmakologi FK Unair Surabaya. Waktu perlakuan adalah sebagai berikut :

- a. 7 hari pertama dipergunakan sebagai tahap aklimatisasi hewan coba di Unit Binatang Bagian Biokimia FK Unair Surabaya
- b. Kemudian sebagian kelompok hewan coba diovariectomi, 1 minggu sesudahnya dilakukan patah tulang pada seluruh hewan coba dan diberi stimulasi medan elektromagnetik sebelum dilakukan terminasi pada Minggu ke-4 pada kelompok-kelompok hewan coba.

Total waktu yang diperlukan adalah sekitar 6 minggu.

4.7 Analisis data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis dengan :

1. Uji Deskriptif
2. Uji Normalitas Distribusi.
3. Uji homogenitas data awal pada variabel berat badan
4. Uji MANKOVA untuk membuktikan perbedaan kelompok perlakuan dan menguji pengaruh variabel moderator, diikuti uji LSD