

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *True Experiment Design* yaitu peneliti melakukan intervensi terhadap sampel dengan menggunakan metode penelitian *post test only control group design*.

B. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Subyek yang diteliti memiliki kriteria sebagai berikut:

1. Usia sekitar 12 minggu (3 bulan)
2. Memiliki berat badan 200-250 gram
3. Berjenis kelamin jantan

Penelitian dilakukan dengan empat kelompok perlakuan. Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan tiap sampel

t = jumlah kelompok = 4

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Jumlah sampel yang digunakan dalam dalam penelitian ini berjumlah 24 ekor tikus. Subyek dipilih secara acak, dibagi menjadi 4 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok I (kontrol negatif), hewan uji hanya diberikan pakan standart saja dan tidak diberikan suplemen tambahan
2. Kelompok II (kontrol positif), hewan uji diberikan pakan standart + suplemen kalk 75 mg/hari per oral
3. Kelompok III (perlakuan I), hewan uji diberikan pakan standart + suplemen nanokalsium 37,5 mg/hari per oral
4. Kelompok IV (perlakuan II), hewan uji diberikan pakan standart + suplemen nanokalsium 75 mg/hari per oral

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dalam waktu 4 bulan (April-Juli 2013). Perawatan tikus di Laboratorium FKIK UMY Yogyakarta, pembuatan nanokalsium di LIPI Serpong, tindakan operasi dan pengambilan gambaran radiologi dilakukan di RSH UGM Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas :

Suplemen nanokalsium berbahan dasar cangkang telur dengan dosis I 37,5 mg/hari per oral, dosis II 75 mg/hari per oral dan suplemen kalk dosis 75 mg/hari per oral (kontrol positif)

2. Variabel Terikat :

Gambaran radiologi femur tikus

3. Variabel Terkendali :

- Subyek penelitian (tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, 12 minggu, jantan berat badan 200-250 g)
- Cara pemeliharaan hewan uji coba : perawatan pasca operasi, pemeliharaan dan pemberian makan hewan

E. Definisi Operasional

- Suplemen nanokalsium yang digunakan berasal dari limbah cangkang telur ayam ras, kemudian diproses menjadi nanopartikel dan hasilnya menjadi nanokalsium. Nanokalsium ini berukuran nanopartikel (1-100 nanometer) dan diberikan ke tikus secara oral. Dosis yang diberikan adalah 37,5 mg/hari (perlakuan I) dan 75 mg/hari (perlakuan II)
- Suplemen kalk diberikan ke tikus sebagai kontrol positif dengan dosis tinggi yaitu 75 mg/hari. (Yudaniayanti, 2008)

- Gambaran radiologi kesembuhan fraktur dinilai dengan sistem skoring radiografi untuk penyembuhan fraktur (skor maksimum untuk perbaikan tulang pada fraktur adalah 8). Pembacaan dan penilaian ini dilakukan secara *randomized* dan *independent* oleh seorang ahli radiologi yang telah terqualifikasi. Ahli radiologi ini sebelumnya tidak mengetahui intervensi masing-masing kelompok, hal ini bertujuan untuk mengurangi bias yang terjadi

Tabel 2. Sistem skoring radiografi untuk penyembuhan fraktur

(Sarban, et al. 2009)

| Kategori | Skor | | | |
|---------------------|-------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Formasi Kalus | Kalus disekitar fraktur penuh | Sedang (>50%) | Ringan (<50%) | Tidak ada |
| Penyambungan Tulang | Jembatan antar tulang penuh | Sedang (>50%) | Ringan (<50%) | Tidak ada |
| Remodeling Korteks | - | Penuh | Ringan (<50%) | Tidak ada |

F. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain :

1. Satu unit alat operasi ortopedi yaitu scalpel, gunting, arteri klem, pinset anatomis dan sirurgis, needle holder, jarum, kain duk, tampon steril, gergaji tulang, pin intramedular (diameter 1 mm dan 1,25 mm, bahan stainless steel),

2. Satu unit alat untuk pembuatan nanokalsium yaitu HEM (*High Energy Milling*) 3D, AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*), XRD (*X-Ray Diffraction*), dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*).
3. Kandang tikus untuk sebelum frakturisasi yang terbuat dari besi dengan ukuran 40 x 30 x 60 cm untuk setiap kelompok yang berisi 5 tikus dan kandang tikus untuk setelah frakturisasi yang terbuat dari besi dengan ukuran 67 x 23 x 16 cm untuk setiap kelompok yang berisi 5 tikus dengan sekat antara satu tikus dan tikus lainnya
4. Wadah organ
Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain :
 1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*
 2. Limbah cangkang telur ayam
 3. Bahan analisis kadar mineral dan logam nanokalsium : 5 ml HNO₃, 0.4 ml H₂SO₄, larutan campuran HClO₄: HNO₃ (2:1), 2 ml aquades dan 0.6 ml HCl
 4. Alkohol 70%
 5. Salep bioplacenton
 6. Ampisilin
 7. Obat anastesi (ketamin (25 mg/kg bb) dan xylazin (8 mg/kg bb))
 8. Pakan tikus

G. Jalannya Penelitian

1. Preparasi Cangkang

Preparasi cangkang telur dilakukan dengan pencucian cangkang. Cangkang kemudian dikeringkan dengan panas matahari. Cangkang yang telah kering selanjutnya dilakukan penghancuran dengan alat *hammer mill* ukuran 60 mesh sehingga menjadi tepung cangkang.

2. Pembuatan Serbuk Nanokalsium

Tepung cangkang selanjutnya di-*treatment* dengan menggunakan alat yang bernama *High Energy Milling (HEM) 3D*. HEM ini digunakan untuk memperkecil ukuran dari partikel – partikel tepung cangkang hingga ke ukuran nanometer. *Milling* dengan menggunakan HEM dilakukan dengan tiga variasi waktu, yaitu 3 jam, 6 jam, dan 9 jam. Serbuk yang berukuran nanometer tersebut selanjutnya akan dilakukan analisis fisika (kandungan mineral dan logam) menggunakan *Atomic Absorption Spectrofometer (AAS)*, *X-Ray Diffraction (XRD)* dan analisis mikroskopis berupa pengukuran partikel dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy (SEM)*.

3. Perlakuan dan pengamatan

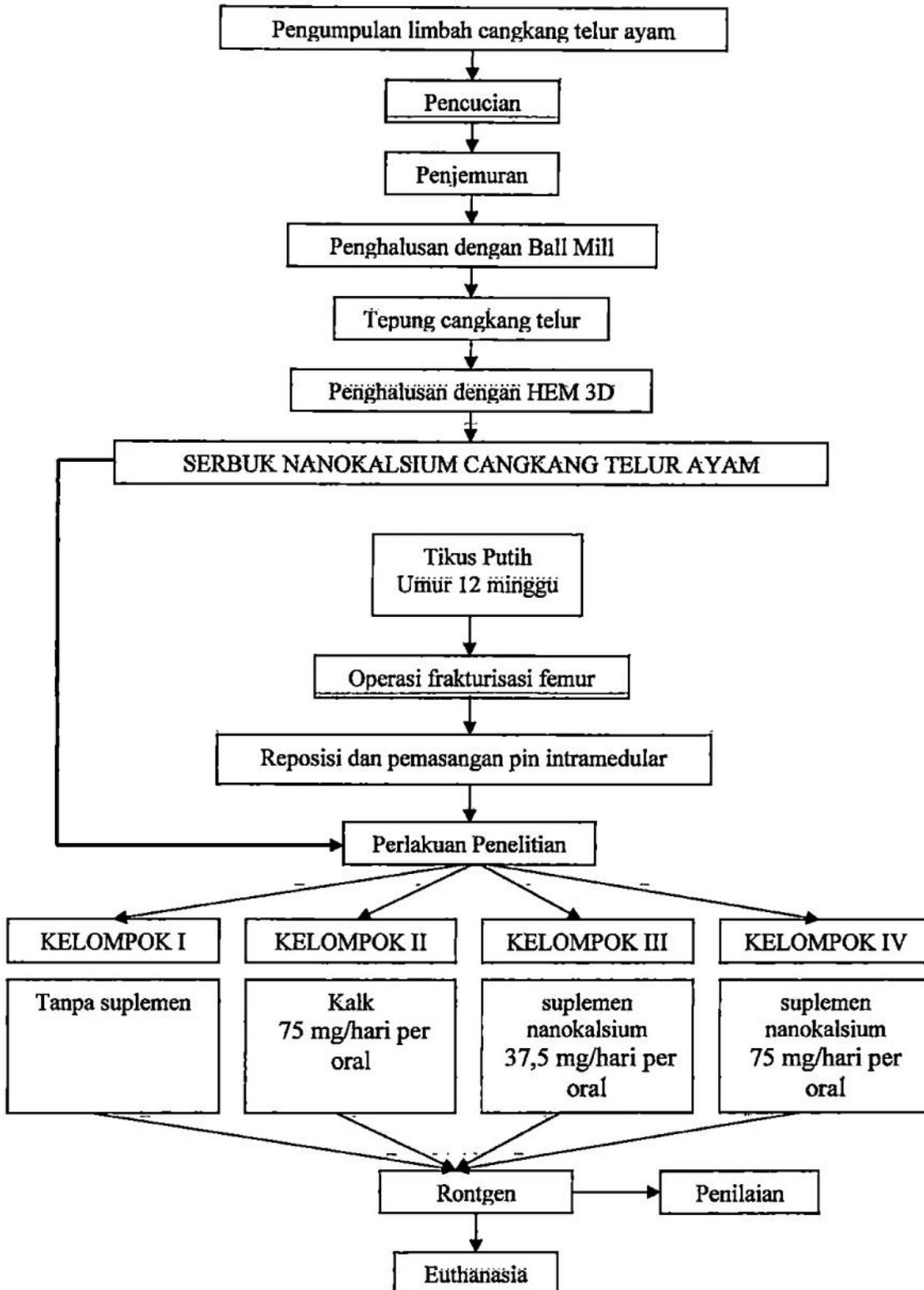
Tikus ditempatkan dalam kandang individu, diadaptasikan terhadap pakan dan lingkungan selama satu minggu. Pada umur 13 minggu semua tikus dilakukan operasi reposisi patah tulang femur dekstra dengan fiksasi pin intramedular. Anastesikum yang digunakan adalah kombinasi ketamin (25 mg/kg BB) dengan xylazine (8 mg/kg BB).

Untuk perawatan pasca bedah semua tikus diinjeksi ampisilin selama lima hari berturut-turut dan luka operasi pada kulit setiap hari diolesi salep bioplacenton sampai luka operasi mengering.

Pada umur 15 minggu, tikus dibagi secara acak dalam 4 kelompok (kelompok I, II, III dan IV) masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus dan ditempatkan dalam kandang individu. Kelompok I sebagai control negatif yang tidak diberikan suplemen tambahan, kelompok II sebagai control positif diberikan suplemen kalsium karbonat 225 mg/hari, kelompok III diberikan suplemen nanokalsium 75 mg/ hari per oral, dan kelompok IV diberikan suplemen nanokalsium 150 mg/hari per oral.

Pada akhir penelitian (tikus umur 19 minggu), dilakukan pengambilan gambar radiologi femur tikus untuk semua kelompok. Setelah itu dilakukan eutanasia dengan cara dislokasi tulang leher.

H. Bagan Penelitian



I. Analisis Data

Gambaran radiologi kesembuhan fraktur dinilai dengan sistem skoring radiografi untuk penyembuhan fraktur (Sarban, et al. 2009). Kemudian dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*. Setelah ditemukan distribusi data yang tidak normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.