

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan metode *post test only with control group design*.

B. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* umur 12 minggu dengan BB 200-250gr. Perhitungan jumlah sampel pada penelitian ini menggunakan rumus Federer dan didapatkan sampel minimal 6 ekor per kelompok, sehingga total sampel adalah 24ekor.

Selanjutnya subyek dibagi menjadi 4 kelompok, satu kelompok sebagai kontrol negatif, satu kelompok sebagai kontrol positif, dan dua kelompok sebagai kelompok perlakuan. Kelompok kontrol negatif tidak diberikan suplemen tambahan, kelompok kontrol positif diberi tambahan suplemen berupa Kalk 75 mg/hari, dan pada kelompok perlakuan diberikan suplemen berupa nanokalsium sebanyak 37,5 mg/hari dan 75 mg/hari.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dalam waktu 4 bulan (April-Juli 2013). Perawatan tikus di Laboratorium FKIK UMY Yogyakarta, pembuatan nanokalsium di LIPI Serpong, tindakan operasi dilakukan di RSH UGM Yogyakarta dan pembuatan preparat histologi di Laboratorium Patologi Anatomi

- b. Satu unit alat untuk pembuatan nanokalsium yaitu *High Energy Milling* (HEM) 3D dan *Particle Size Analyze* (PSA).
- c. Kandang tikus untuk sebelum frakturisasi yang terbuat dari besi dengan ukuran 40 x 30 x 60 cm untuk setiap kelompok yang berisi 6 tikus dan kandang tikus untuk setelah frakturisasi yang terbuat dari besi dengan ukuran 67 x 23 x 16 cm untuk setiap kelompok yang berisi 6 tikus dengan sekat antara satu tikus dan tikus lainnya.
- d. Wadah organ

2. Bahan yang Digunakan

- a. Limbah cangkang telur ayam
- b. 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
- c. Betadine
- d. Ampisilin
- e. Obat anastesi (ketamin (25 mg/kg bb) dan xylazin (8 mg/kg bb))
- f. Alkohol 70%
- g. Pakan tikusstandar
- h. Bahan-bahan untuk pembuatan preparat histopatologik tulang adalah

edukasi, formalin 10% digunakan untuk dekalsifikasi tulang

F. Tahapan Penelitian

1. Preparasi Cangkang

Preparasi cangkang telur dilakukan dengan pencucian cangkang. Cangkang kemudian dikeringkan dengan pengovenan selama 6 jam pada suhu 50⁰ C. 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.

Setelah melalui proses *milling* dengan menggunakan HEM, tepung cangkang dikarakterisasi. Karakterisasi dilakukan dengan menggunakan *Particle Size Analyze (PSA)*.

3. Perlakuan dan Pengamatan

Seluruh sampel penelitian berjumlah 24 ekor tikus yang berumur 12 minggu dengan berat 200-250 gr dan dibagi menjadi 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 tikus.

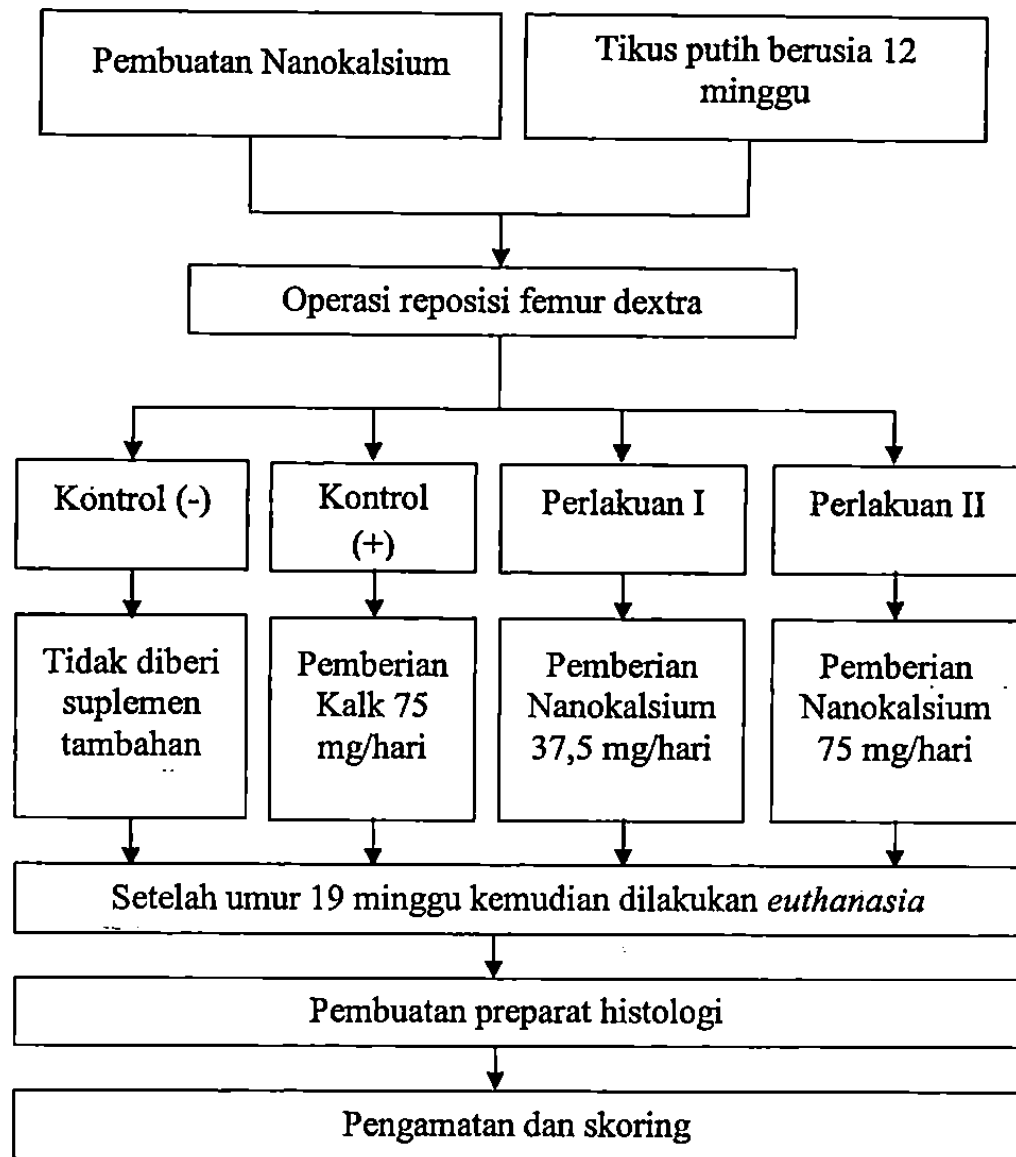
Dilakukan operasi reposisi patah tulang femur dextra dengan menggunakan anestesi ketamin (25 mg/kg bb) dan xylazin (8 mg/kg BB),

Untuk perawatan paskaoperasi semua tikus diberi suntikan ampisilin intramuskuler selama lima hari secara berturut-turut, lalu untuk perawatan luka bekas operasi diolesi betadine sampai luka mengering. Setiap harinya semua tikus diberikan pakan standar.

Tiga minggu setelah operasi diberikan suplemen untuk penyembuhan tulang selama 4 minggu. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif tidak diberikan perlakuan, kelompok kedua diberikan tablet Kalk 75 mg/hari sebagai kontrol positif, kelompok ketiga diberikan nanokalsium 37,5 mg/hari peroral (perlakuan I), dan kelompok keempat diberikan nanokalsium 75 mg/hari (perlakuan II).

Pada akhir penelitian (tikus umur 19 minggu), semua tikus di-*eutanasia* dengan cara dislokasi tulang leher. Tulang femur kanan diambil dan difiksasi dalam larutan formalin 10%, disiapkan untuk proses dekalsifikasi untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode blok paraffin dengan teknik pengecatan hemaktosilin dan eosin (HE).

Preparat histologi dibaca menggunakan mikroskop dengan prebesaran 100x dan dilakukan skoring berdasarkan kriteria yang telah



G. Analisis Data

Data skor penyembuhan jaringan tulang dihitung dengan skoring derajat histopatologi tulang (Yudaniayanti, 2003). Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk*. Apabila didapatkan distribusi data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *Oneway Anova* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc*