

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Penelitian dilakukan selama 1 bulan yaitu pada bulan Januari 2024.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk mendukung dalam penelitian ini adalah lampu operasi, *clipper*, skalpel, gunting, pinset, klem arteri, needle holder, spektrofotometer UV-VIS, mikropipet, kandang tikus, tempat makan dan minum.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk mendukung penelitian ini adalah benang monofilamen 6.0, benang silk 2.0, sarung tangan latex, tabung plain, tabung mikrohematokrit, kapas, *underpad*, spuit 1 cc, anastesi ketamin (Ket-A®), acepromazine (Castran®), tikus *Sprague Dawley* jantan berat ± 300 gram usia 6 bulan, sekam, pakan tikus, air mineral, *povidone iodine*, NaCl, *yellow tip*, reagen kerja kreatinin meliputi reagen 1 (asam pikrat) dan reagen 2 (sodium hidroksida), reagen kerja urea meliputi reagen 1 dengan komposisi larutan penyangga (phosphate buffer, pH < 13, dan natrium hipoklorit) dan reagen 2 (urease).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorik menggunakan uji T sampel bebas. Sampel dikoleksi secara acak dari semua kelompok perlakuan pada akhir penelitian (*post random sampling*). Hewan coba dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, yaitu:

1. K1: Kontrol sehat tanpa induksi stroke
2. K2: Kontrol positif dengan induksi stroke selama 4 jam

Perhitungan jumlah hewan model yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan rumus *Federer*, yaitu: $(n-1) k \geq 16$. Keterangan : n = ulangan dan k = kelompok perlakuan. Perhitungannya sebagai berikut : $(n-1) k \geq 16 = (n-1) 2 \geq 16 = 2n - 2 \geq 16 = 2n \geq 18 . n = 9$ ekor.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu variabel bebas : tikus *Sprague Dawley*. Variabel kendali : ligasi arteri karotis komunis selama 4 jam. Variabel terikat : kadar BUN dan kreatinin.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan 24 jam setelah induksi stroke. Tikus diambil darahnya kemudian dipisahkan dengan serumnya. Serum tersebut digunakan untuk pemeriksaan BUN dan kreatinin serum. Koleksi sampel darah dilakukan dengan mengambil darah menggunakan mikrohematokrit di mata tikus

melalui vena *ophthalmica*. Darah kemudian di sentrifus untuk memisahkan serum darah.

3.4.1 Pemeriksaan Kadar *Blood Urea Nitrogen* (BUN)

Prosedur penilaian BUN dilakukan dengan cara sampel darah yang telah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Jumlah sampel serum yang diperlukan adalah 10 μ l. Siapkan reagen 1 dengan komposisi larutan penyangga phosphate buffer, pH < 13, 120 mmol/L dan natrium hipoklorit 10 mmol/L. reagen 2 yang digunakan adalah urease >500 KU/I. 10 μ l sampel serum ditambahkan reagen 1 sebanyak 1000 μ l, diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit. Campuran tersebut kemudian ditambahkan reagen 2 ditambahkan sebanyak 1000 μ l, diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Campuran terakhir tersebut dianalisis dengan alat spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 578 nm (Tandi *et al.*, 2020).

3.4.2 Pemeriksaan Kadar Kreatinin

Prosedur penilaian kreatinin juga dilakukan dengan cara sampel darah yang telah dikoleksi di sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Siapkan reagen 1 (asam pikrat) 100 μ l dan reagen 2 (sodium hidroksida) 100 μ l. Jumlah sampel serum yang diperlukan adalah 100 μ l kemudian ditambahkan reagen 1 dan 2 dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Campuran tersebut didiamkan selama 30 detik kemudian dianalisis dengan alat spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 492 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak 2 kali

dengan analisis pencatatan pertama selama 30 detik kemudian pengukuran ke-2 selama 2 menit (Tandi *et al.*, 2020).

3.5 Parameter Penelitian

Parameter penelitian adalah kadar BUN dan kreatinin pada masing-masing kelompok kontrol sehat dan kelompok diinduksi stroke.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sampel penelitian menggunakan tikus *Sprague Dawley* jantan, sehat, dengan berat ± 300 gram usia 6 bulan yang dibagi menjadi 2 kelompok dengan populasi masing-masing 9 ekor. Tikus dipelihara di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Wijaya Kusuma Surabaya. Tikus diadaptasikan selama 7 hari untuk penyesuaian lingkungan serta pemeriksaan kesehatan. Tikus dipelihara pada kandang kotak plastik dengan ventilasi yang cukup dan alas sekam kayu supaya kandang tidak lembab. Tikus diberi pakan pelet dan minum air mineral secara *ad libitum*.

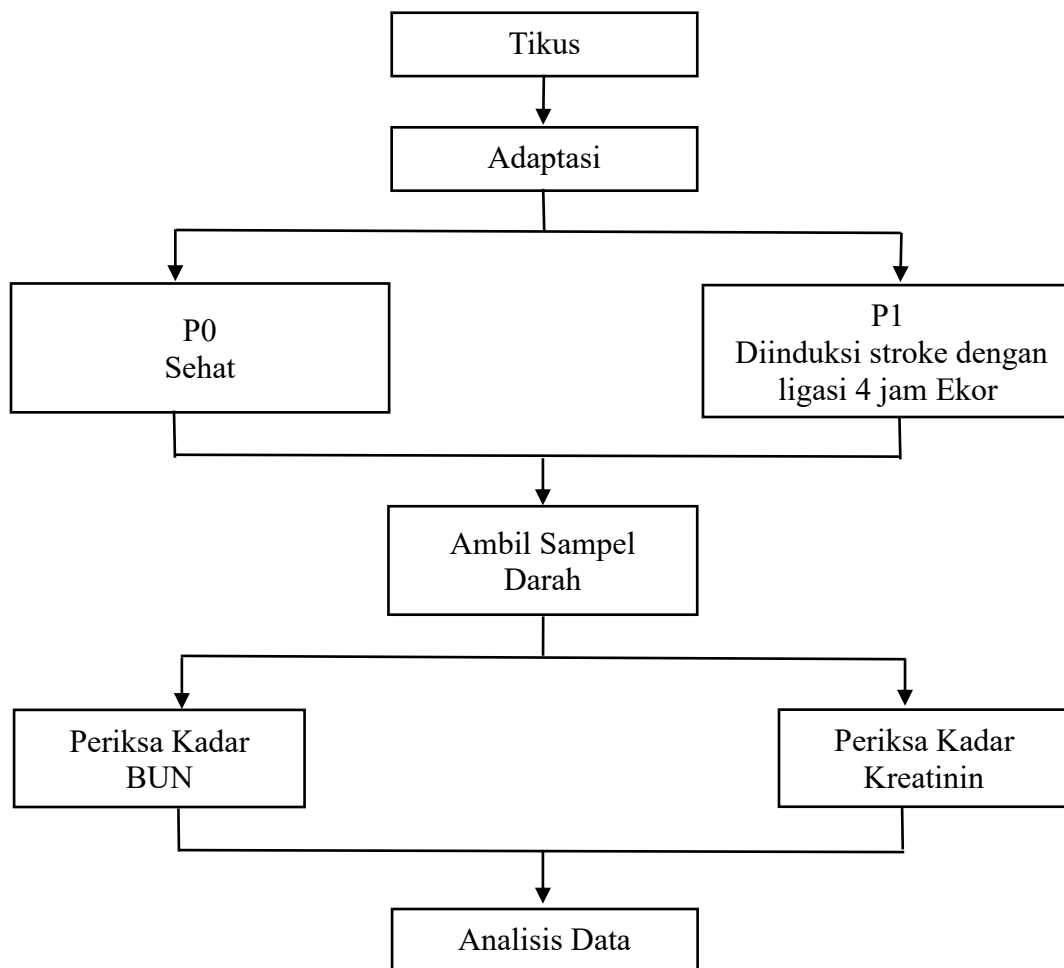
3.6.2 Induksi Stroke pada Tikus Sprague Dawley

Induksi stroke pada tikus *Sprague Dawley* dilakukan dengan cara ligasi arteri karotis komunis selama 4 jam. Tindakan awal persiapan tikus dipuaskan selama 6 jam. Tikus dianestesi dengan pemberian sedasi *acepromazine* (Castran®) dengan dosis 2,5 mg/kg BB secara intraperitoneal, kemudian dilakukan pembiusan

dengan anestesi umum ketamin dengan dosis 75 mg/kg BB secara intraperitoneal (Yunani dkk.,2015). Dosis ketamin untuk tikus usia 2-6 bulan adalah 50-100 mg/kg BB (Krissanti *et al.*, 2023).

Tikus yang telah teranestesi dengan sempurna kemudian ditempatkan dimeja operasi dan dilakukan persiapan operasi dengan mencukur rambut pada bagian leher dan didesinfeksi dengan *povidone iodine*. Tikus diinsisi pada bagian kulit leher sepanjang 2 cm dan muskulus dibuka untuk menemukan arteri karotis komunis. Arteri karotis komunis diligasi di 3 percabangan (CCA, ICA, ECA) dengan benang monofilamen 6.0. Luka dijahit menggunakan jahitan terputus sederhana dengan benang silk 2.0. Reperfusi arteri karotis komunis dilakukan setelah 4 jam pasca ligasi dengan hati-hati. Luka kembali dijahit dengan metode jahitan terputus sederhana menggunakan benang silk 2.0.

3.7 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3. 1 Kerangka Penelitian

3.8 Analisis Data

Data penelitian dari penelitian eksperimental laboratorik dianalisis menggunakan Uji T sampel bebas. Uji statistik ini membandingkan rata-rata dari dua kelompok sampel yang saling bebas. Dasar pengambilan putusan H_0 diterima jika nilai signifikan $< 0,05$ yaitu terdapat pengaruh induksi stroke terhadap kadar

BUN dan kreatinin. H0 ditolak jika nilai signifikan $> 0,05$ yaitu tidak terdapat pengaruh induksi stroke terhadap kadar BUN dan kreatinin.