

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini termasuk dalam lingkup disiplin ilmu Kardiologi dan Farmakologi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang (FMIPA Unnes) untuk perlakuan dan di Laboratorium Diagnostik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada untuk pemeriksaan sampel pada hewan coba. Dibutuhkan waktu dua bulan untuk menyelesaikan seluruh prosedur penelitian.

#### **3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian berjenis eksperimental murni dengan rancangan *randomized posttest only control group design*.

#### **3.4 Populasi dan Sampel**

##### **3.4.1 Populasi Target**

Populasi target dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan berumur 6-8 minggu.

### **3.4.2 Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Biologi FMIPA Unnes. Hewan coba kemudian dipilih secara acak dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi.

### **3.4.3 Sampel Penelitian**

#### **3.4.3.1 Kriteria Inklusi**

- 1) Tikus wistar jantan
- 2) Umur 6-8 minggu
- 3) Berat tubuh 200-250 gram
- 4) Bergerak aktif
- 5) Belum pernah digunakan untuk penelitian

#### **3.4.3.2 Kriteria Eksklusi**

- 1) Memiliki kelainan anatomis
- 2) Mati selama masa adaptasi
- 3) Mati saat diberi perlakuan

#### **3.4.3.3 Kriteria Dropout**

Hewan coba yang mati dalam rentang waktu antara injeksi isoproterenol pertama hingga sebelum diambil sampel darahnya dianggap *dropout* dan tidak diambil sample darahnya untuk dilakukan pengukuran kadar CKMB.

### **3.4.4 Cara Sampling**

Sampel yang diteliti pada penelitian ini diambil secara *simple random sampling*.

### **3.4.5 Besar Sampel**

Penentuan besar sampel dilakukan menurut ketentuan WHO, yaitu minimal 5 ekor tikus per kelompok. Dalam penelitian ini tikus yang akan digunakan sebanyak 7 ekor tiap kelompok untuk mempertimbangkan kemungkinan *drop out*.

## **3.5 Variabel Penelitian**

### **3.5.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama RIPC tikus wistar

### **3.5.2 Variabel Terikat**

Kadar CKMB tikus wistar.

### 3.6 Definisi Operasional

**Tabel 3. Definisi Operasional**

No.	Variabel	Unit	Skala
1.	<b>RIPC</b>  Pengikatan lengan kiri depan tikus wistar selama beberapa waktu kemudian ikatannya dilepas selama beberapa waktu dan diulang dalam beberapa siklus	Menit	Numerik
2.	<b>Kadar CKMB</b>  Kadar CKMB hewan coba yang diukur menggunakan metode spektrofotometri di laboratorium	U/L	Numerik

### 3.7 Cara Pengumpulan Data

#### 3.7.1 Bahan

- 1) (-)-Isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich, Singapura)
- 2) Aquadest
- 3) Aqua bidestilata steril *pro injectionem*
- 4) Kloroform

- 5) Pakan standar mencit (*hi-pro vite*)
- 6) Sekam kayu
- 7) Reagen CKMB

### **3.7.2 Alat**

- 1) Kandang hewan coba
- 2) Sonde lambung
- 3) Alat makan dan minum hewan coba
- 4) Timbangan digital
- 5) Alat suntik (sput) 25 gauge
- 6) Tali
- 7) Spektrofotometer
- 8) Sentrifugator
- 9) Mikropipet
- 10) Kuvet
- 11) Tabung reaksi
- 12) Rak tabung reaksi
- 13) *Eppendorf / Vacum med*
- 14) Penghitung waktu
- 15) Pengatur Suhu
- 16) Kotak Pendingin

### **3.7.3 Jenis Data**

Data yang diperoleh adalah data primer.

### **3.7.4 Cara Kerja**

#### **3.7.4.1 Pemilihan Hewan coba**

Hewan coba penelitian didapatkan dari Laboratorium Biologi FMIPA Unnes dan diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

#### **3.7.4.2 Persiapan**

1) Hewan coba diadaptasikan di kandang berukuran 25x25x25 cm agar dapat bergerak bebas.

2) Hewan coba juga diberi pakan standar selama 1 minggu.

3) Hewan coba dibagi secara *simple random sampling* ke dalam 3 kelompok berisikan 7 ekor menjadi kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), dan perlakuan 2 (P2)

#### **3.7.4.3 Pelaksanaan**

1) Hewan coba dalam kelompok diberikan intervensi sesuai kelompoknya.

2) Kelompok K sebagai kontrol diberi pakan standard dan diinduksi dengan isoproterenol untuk mendapatkan efek infark miokard.

3) Kelompok P1 diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus 5 menit oklusi dan 5 menit reperfusi lalu diinduksi dengan isoproterenol.

4) Kelompok P2 diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus 15 menit oklusi dan 15 menit reperfusi lalu diinduksi dengan isoproterenol.

5) Pengukuran kadar CKMB hewan coba.

#### **3.7.4.4 Pengambilan Sampel Serum**

1) Tikus dimasukkan dalam selongsong yang sesuai dengan ukurannya.

- 2) Ekor tikus dijulurkan keluar lalu vena lateralis pada ekor dipotong 0,2 – 2 cm dari pangkal ekor dengan silet steril.
- 3) Darah ditampung pada *eppendorf*, kemudian diletakkan miring 45° dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar, selanjutnya dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum.
- 4) Serum dimasukkan ke dalam kotak pendingin agar tidak mudah rusak.

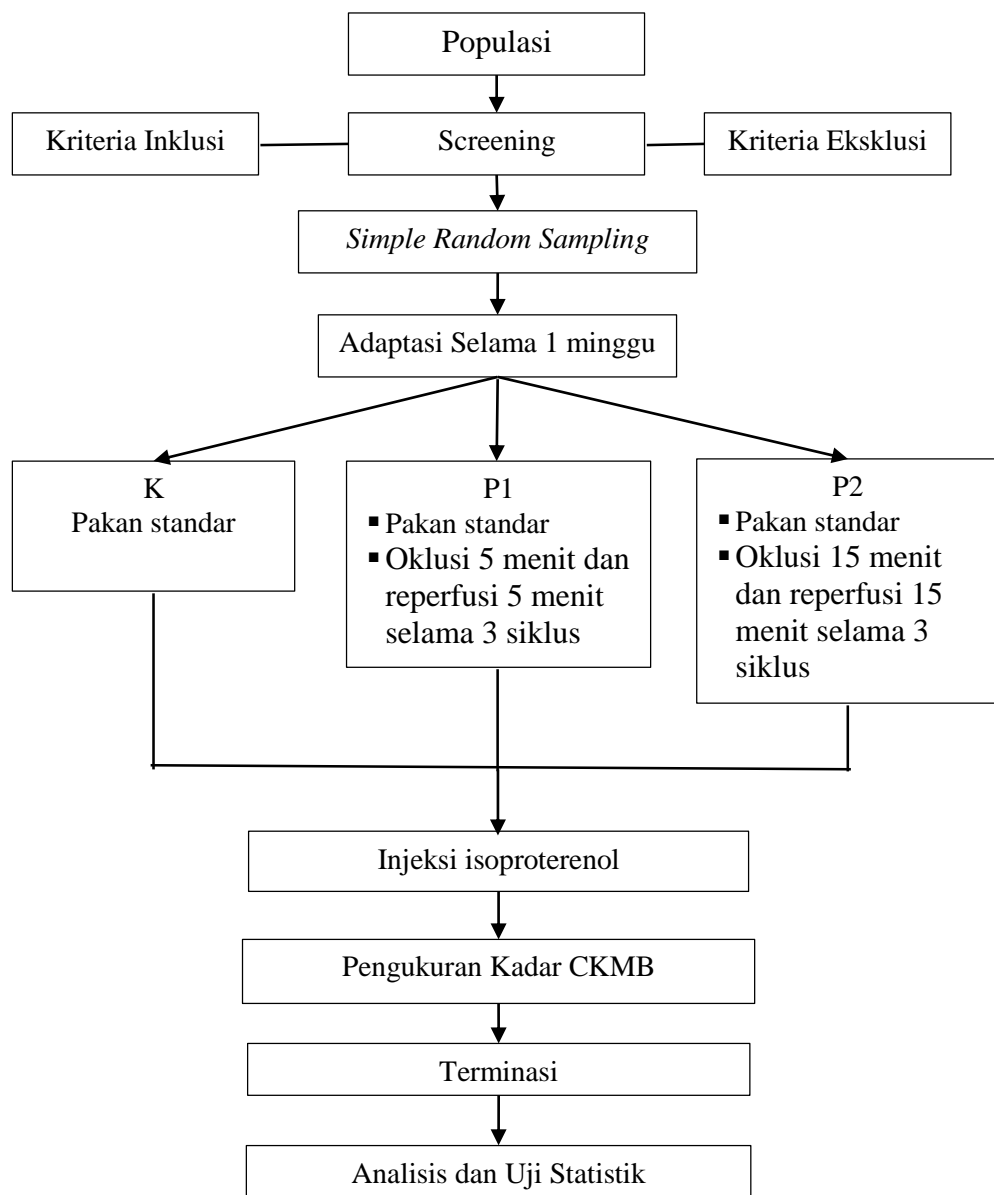
#### **3.7.4.5 Pengukuran Kadar CKMB**

- 1) Menyiapkan reagen CKMB.
- 2) Spektrofotometer di Nol-kan pada absorbansi 340nm dengan menggunakan air suling.
- 3) Masukkan 1 ml reagen CKMB pada masing-masing kuvet kontrol dan sampel.
- 4) Masukkan 50 $\mu$ l serum ke dalam masing-masing kuvet, aduk rata dan inkubasi selama 5 menit.
- 5) Setelah 5 menit, lihat dan catat perubahan absorbansinya setiap menit dalam 2 menit.
- 6) Tentukan absorbansi rata-rata per menit ( $\Delta A/Min$ ) dan kemudian kalikan dengan faktor 6752 ( $3376 \times 2$ ) untuk memperoleh aktivitas CKMB dalam satuan U/L.

### 3.7.4.6 Terminasi Hewan Coba

Setelah semua proses penelitian selesai dikerjakan, hewan coba diterminasi dengan cara dibius dengan inhalasi kloroform kemudian dilakukan dekapitasi.

### 3.8 Alur Penelitian



**Gambar 6. Alur Penelitian**



### **3.9 Analisis Data**

Data yang terkumpul akan terlebih dahulu dimasukkan ke dalam file Microsoft Excel. Pengelolaan data lebih lanjut akan menggunakan program IBM SPSS Statistics.

Data primer berupa kadar CKMB yang diperoleh setelah dilakukan intervensi akan diolah menggunakan uji normalitas data Shappiro-Wilk. Apabila uji normalitas menunjukkan persebaran data yang normal maka akan dilakukan pengolahan data dengan uji one way Anova dan post hoc. Apabila data tidak berdistribusi normal maka data dianalisis dengan uji Kruskal Willis dan Mann Whitney-U.

Uji hipotesis dianggap signifikan secara statistik apabila  $p < 0.05$  dengan interval kepercayaan sebesar 95%.

### **3.10 Etika Penelitian**

Ethical clearance diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Universitas Diponegoro dan RSUP dr. Kariadi sebelum penelitian dilakukan