

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup

Penelitian ini memiliki ruang lingkup pada ilmu Biokimia dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

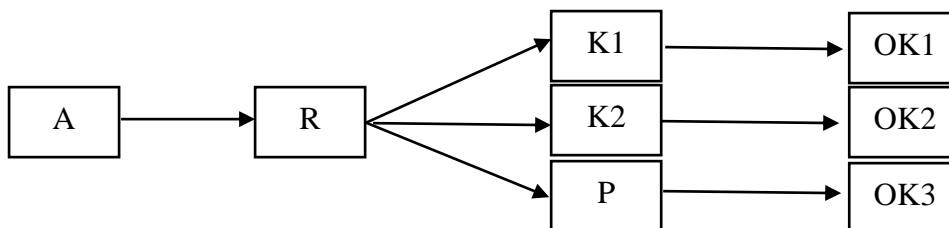
Tempat:

- Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang
- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Waktu : Mei-Juni 2017

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *true experimental post-test only with control group design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian. Perlakuan yang diberikan adalah dengan memberikan vitamin C pada tikus Sprague Dawley yang diberi paparan *Heat stress*.



Gambar 9. Skema Desain Penelitian

Keterangan:

- A : Adaptasi. Pada kelompok ini sampel hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* untuk beradaptasi 7 hari.
- R : Randomisasi. Sampel akan dibagi ke dalam 3 kelompok 3 secara acak.
- K1 : Kelompok kontrol negatif tidak diberi perlakuan.
- K2 : Kelompok kontrol positif akan diberikan paparan *heat stress* 43 °C selama 70 menit
- P : Kelompok akan diberikan vitamin C melalui sonde lambung dengan dosis 0.075 mg/g BB, 2 jam sebelum dilakukan paparan *heat stress* dengan suhu 43 °C selama 70 menit.
- OK 1 : Kadar GSH kelompok K1
- OK 2 : Kadar GSH kelompok K2
- OK 3 : Kadar GSH kelompok P

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus Sprague Dawley yang dikandangkan dalam kandang yang terbuat dari bahan stainless steel dengan siklus pencahayaan 12 jam, mendapat makan dan minum *ad libitum* dan suhu kandang 28-32°C. Tikus Sprague Dawley dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme mirip dengan manusia.

3.4.2.1 Kriteria inklusi

1. Tikus jantan Sprague Dawley
2. Usia tikus 2 bulan
3. Berat badan tikus 250-300 gram

3.4.2.2 Kriteria eksklusi

1. Kelainan anatomis pada tikus
2. Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

3.4.2.3 Kriteria *drop out*

1. Tikus mati saat penelitian

3.4.3 Cara sampling

Alokasi sampel dengan menggunakan metode *Simple Random Sampling*.

3.4.4 Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk setiap kelompoknya, sebagai antisipasi apabila terdapat tikus yang *drop out* saat penelitian berlangsung. Mengingat terdapat 2 kelompok kontrol dan 1 kelompok perlakuan pada penelitian ini, maka total tikus yang dibutuhkan selama penelitian berjumlah 18 ekor. Penentuan jumlah tikus untuk masing-masing kelompok sesuai dengan ketentuan dikeluarkan oleh WHO yaitu minimal 5 ekor tikus untuk setiap kelompoknya.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas : vitamin C

Variabel terikat : kadar GSH serum tikus Sprague Dawley

Variabel kontrol : paparan *heat stress*

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi operasional dan cara pengukuran	Unit	Skala
1.	Vitamin C	Vitamin C diberikan pada tikus Sprague Dawley dengan dosis 0.075 mg/g BB melalui sonde lambung 2 jam sebelum paparan <i>heat stress</i> .	-	Nominal
2.	GSH	Kadar GSH ditentukan dengan pemeriksaan spektrofotometer yang menggunakan metode DTNB dengan λ 412 nm.	μ M/ml	Ratio

3.7 Pengumpulan Data

3.7.1 Alat

1. Sonde lambung
2. Timbangan
3. Spuit
4. Spektrofotometer
5. Kuvet
6. Inkubator
7. Termometer ruangan
8. Mikropipet
9. Tabung Reaksi
10. Sentrifus
11. *Waterbath*
12. Vortex

3.7.2 Bahan

1. Darah Tikus Sprague Dawley
2. Vitamin C
3. Pakan Standard dan air minum
4. Reagen DTNB: 39,6 mg DTNB dilarutkan dalam 10 ml bufer fosfat 0,1 M pH 7,0

5. TCA 5%: Larutan standar TCA 25% diencerkan dengan air suling sampai didapat konsentrasi TCA 5%
6. Aquades

3.7.3 Jenis Data

Kadar GSH serum tikus setelah paparan *heat stress* yang telah diberi vitamin C merupakan data primer.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Penyesuaian dosis

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa dosis optimal pemberian vitamin C pada hewan coba tikus sebanyak 0.075 mg/g BB sebelum paparan stres oksidatif.¹⁴ Sampai saat ini efek toksik bermakna belum dijumpai pada pemberian vitamin C pada dosis 0.2 mg/g BB.³⁷

Berdasarkan hal-hal tersebut, peneliti menggunakan pemberian dosis 0.075 mg/g BB. Menyesuaikan kriteria inklusi sampel yaitu berat badan hewan sebesar 250-300 g, didapatkan dosis vitamin C yang harus diberikan pada tikus berkisar antara 18,75-22,5 mg. Pada penelitian ini, untuk memberikan kemudahan dan kepastian peneliti dalam memberikan vitamin C, ditetapkan dosis vitamin C yang diberikan adalah 22 mg per tikus.

3.7.4.2 Perlakuan terhadap hewan coba

Seluruh sampel tikus Sprague Dawley akan dikandangkan secara berkelompok di Lab Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Selama penelitian berlangsung, sampel akan mendapatkan pakan dan air minum standar yang sama. Untuk adaptasi, sampel hanya akan diberikan pakan standar dan air

minum *ad libitum* selama tujuh hari pertama. Selanjutnya, sampel akan dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok sebagai berikut.

1) Kelompok Kontrol Negatif (K1)

Kelompok kontrol negatif tidak mendapat perlakuan.

2) Kelompok Kontrol Positif (K2)

Kelompok kontrol positif mendapat perlakuan pemaparan *heat stress* 43°C selama 70 menit.

3) Kelompok Perlakuan dengan pemberian Vitamin C (P)

Vitamin C dengan dosis 0,075 mg/g berat badan diberikan dengan sonde 2 jam sebelum pemaparan *heat stress* 43°C selama 70 menit.

Kelompok K2 dan P akan mendapat paparan suhu 43°C selama 70 menit setelah pemberian vitamin C 2 jam sebelumnya. Kemudian dilakukan pengambilan sampel darah kelompok K1, K2, dan P. Darah diambil dari plexus retroorbital.

3.7.4.3 Pemeriksaan kadar GSH

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar glutathion darah (GSH) adalah metode ditio bisnitro benzoate (DTNB). Prinsip pengukurannya adalah reaksi antara DTNB dengan GSH menghasilkan senyawa DTNB yang berwarna kuning. Setiap tikus diambil darahnya melalui plexus retroorbitalis sebanyak kurang lebih 1 ml dan ditampung dalam tabung uji berisi Heparin.

a. Persiapan sampel darah

Darah dalam tabung berisi heparin disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Plasma dipisahkan dan digunakan untuk pengukuran kadar GSH.

b. Pembuatan kurva kalibrasi untuk GSH

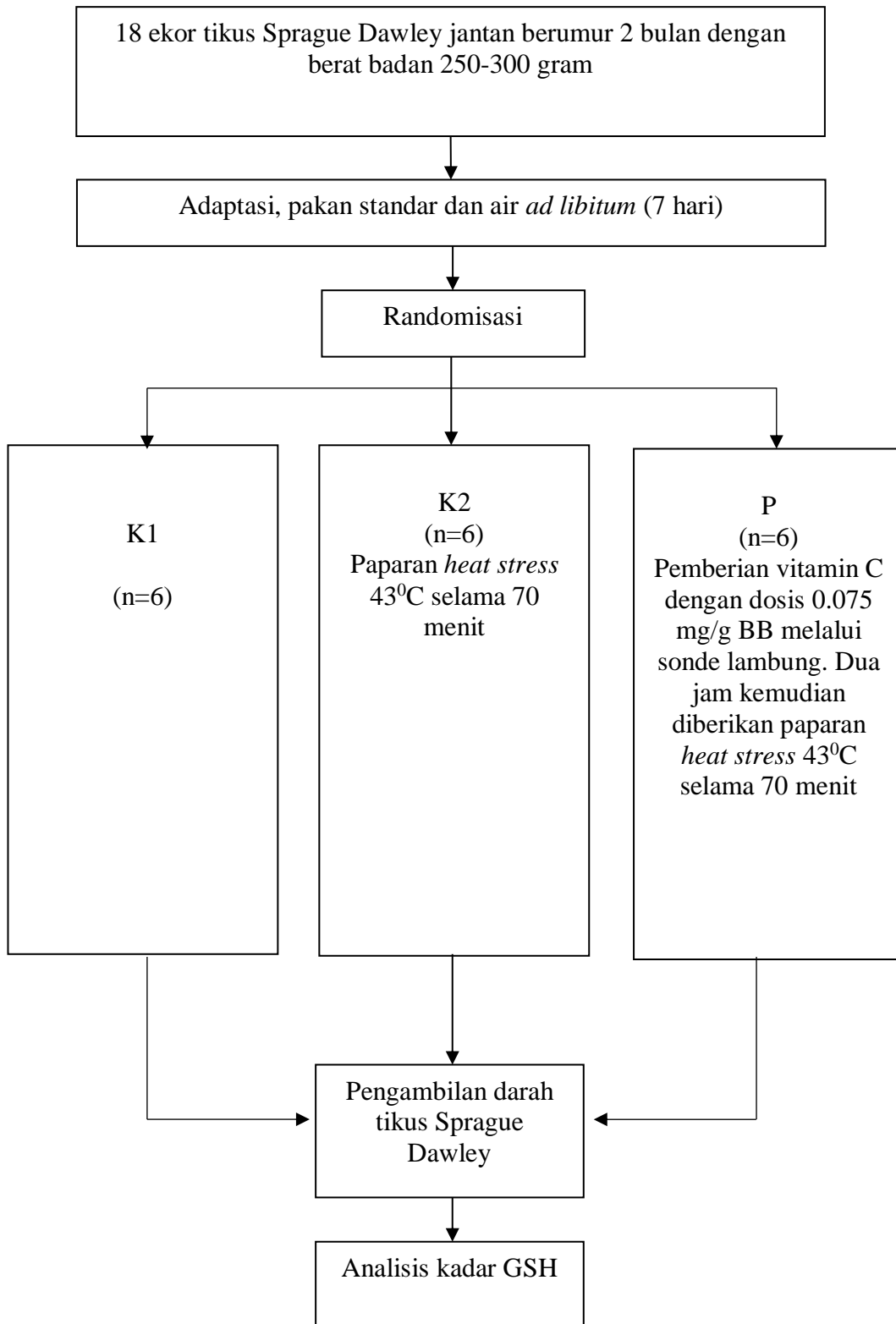
- Buat standar larutan glutation: 2mg/ml dalam bufer fosfat 0,1 M pH 8,0.
- Dari larutan standar diambil 0,0 μ l, 5,0 μ l, 10,0 μ l, dan 50,0 μ l.
- Larutan bufer fosfat 0,1 M pH 8,0 ditambahkan ke dalam masing-masing tabung hingga volumenya menjadi 9 ml.
- Tambahkan 1 ml larutan TCA 5% ke masing-masing tabung.
- Kocok sampai homogen.
- 4,0 ml dari masing-masing tabung diambil dan ditambahkan 0,05 ml reagen DTNB.
- Sisa larutan dari tabung digunakan sebagai blanko.
- Ukur uji serapan absorban dan absorban standar terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.
- Buat kurva kalibrasi dengan menghubungkan nilai serapan sebagai ordinat (y) dan konsentrasi larutan standar sebagai absis (x).

c. Pengukuran sampel plasma

- Tambahkan 8,90 ml bufer fosfat pH 8,0 dan 1,0 ml TCA 5% ke dalam tabung yang berisi 0,250 ml plasma.
- Kocok hingga homogen.

- Larutan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 5 menit
- 4,0 ml supernatan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,05 ml DTNB, lalu diamkan selama 1 jam.
- Sisa larutan supernatan digunakan sebagai blanko.
- Ukur serapan absorban sampel terhadap blanko dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data primer yang didapatkan dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Apabila data berdistribusi normal dilakukan uji *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, bila terdapat perbedaan yang bermakna akan dilanjutkan dengan uji *post hoc* untuk uji perbedaan 2 kelompok. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji *Kruskal Wallis*, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika Penelitian

Etichal clearance No. 49/EC/H/FK-RSDK/VII/2017 telah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang.