

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah di bidang Biokimia dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

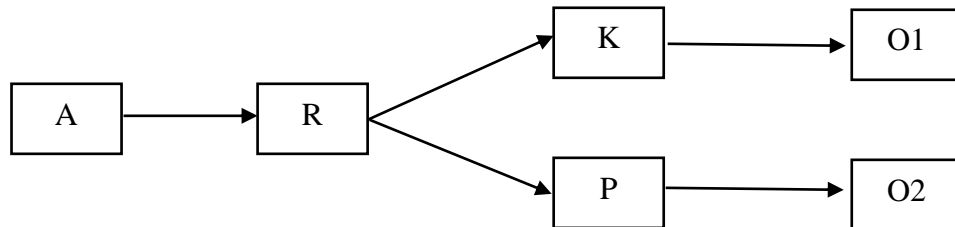
Perlakuan dan pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan pemeriksaan laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2017.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian *post test only control group* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jantan yang diberikan paparan *heat stress* pada suhu 43⁰ C selama 70 menit.

Hewan coba yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dibagi secara acak menjadi 2 kelompok. Satu kelompok diberikan paparan *heat stress* pada suhu 43⁰ C selama 70 menit dan berfungsi sebagai kontrol. Satu kelompok diberikan paparan *heat stress* pada suhu 43⁰ C selama 70 menit dan vitamin C

dengan dosis 0,075 mg/g BB per tikus selama 2 jam dan berfungsi sebagai perlakuan. Keluaran dari penelitian ini adalah kadar SOD plasma.



Gambar 9. Rancangan penelitian

Keterangan:

- A :Adaptasi. Pada kelompok ini sampel hanya akan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* untuk beradaptasi 7 hari.
- R :Randomisasi
- K :Kelompok yang terpapar *heat stress* panas pada suhu 43⁰C selama 70 menit.
- P :Kelompok perlakuan yang diberi vitamin C melalui sonde lambung dengan dosis 0,075 mg/g BB selama 2 jam dan tekanan panas panas pada suhu 43⁰C selama 70 menit.
- O1 :Kadar SOD plasma kelompok K
- O2 :Kadar SOD plasma kelompok p

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* jantan.

3.4.2 Sampel Penelitian

Besar sampel ditentukan berdasarkan kriteria WHO dalam *Research Guideline for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*⁴⁹, yaitu

minimal 5 ekor tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk mengantisipasi apabila terdapat tikus yang mati saat adaptasi dan perlakuan. Dengan demikian, jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak adalah 12 sampel.

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

- 1) Umur tikus 2-3 bulan
- 2) Tikus jantan
- 3) Berat badan tikus 250-300 gram

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Kelainan anatomis
- 2) Pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit

3.4.2.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus mati selama masa penelitian

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Pemberian vitamin C

Variabel terikat : Kadar SOD plasma

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4. Definisi operasional

| No | Variabel | Definisi operasional dan cara pengukuran | Unit | Skala |
|----|---------------------|--|------------------|---------|
| 1. | Pemberian vitamin C | Vitamin C diberikan pada tikus <i>Sprague Dawley</i> dengan dosis 0,075 mg/g BB melalui sonde lambung 2 jam sebelum paparan <i>heat stress</i> | | Nominal |
| 2. | Kadar SOD plasma | Kadar antioksidan dalam tubuh yang diukur pada plasma dengan menggunakan metode ELISA | $\mu\text{g/ml}$ | Rasio |

3.7 Analisis data

Data yang diperoleh adalah data primer. Data dimasukkan ke dalam *file* komputer dan dianalisis dengan menggunakan program *SPSS 18 for Windows*[®]. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat sebaran distribusi data. Uji *Levene's test* digunakan untuk uji homogenitas data dan uji t tidak berpasangan digunakan untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, dengan nilai derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ pada interval kepercayaan 95%.

3.8 Instrumen Penelitian

3.8.1 Alat

- 1) Sonde lambung
- 2) Timbangan
- 3) Tabung reaksi
- 4) Inkubator panas
- 5) ELISA *reader*
- 6) ELISA *washer*
- 7) *Well plate*
- 8) Mikropipet
- 9) Pipet hematocrit
- 10) Spektrofotometer

3.8.2 Bahan

- 1) Plasma darah tikus *Sprague Dawley* jantan
- 2) Vitamin C
- 3) Pakan standar hewan coba dan minum
- 4) EDTA
- 5) SOD *activity ELISA Kit*

3.8.3 Prosedur Penelitian

3.8.3.1 Dosis Vitamin C

Vitamin C yang dipakai berbentuk bubuk dengan iodometri 99,7-100,5%. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa dosis optimal pemberian vitamin C pada hewan coba berjenis tikus sebelum paparan stres oksidatif adalah sebanyak 0.075 mg/g BB.⁵⁰ Selain itu pada penelitian yang bertujuan mengetahui dosis toksik akut pada hewan diketahui bahwa pemberian vitamin C pada dosis 0,2 mg/g BB belum menunjukkan efek toksik bermakna.⁵¹

Berdasarkan hal-hal tersebut, pada penelitian ini digunakan dosis 0.075 mg/g BB. Selanjutnya sesuai kriteria inklusi sampel yaitu berat badan hewan sebesar 250-300 g, maka didapatkan dosis vitamin C yang harus diberikan berkisar antara 18,75-22,5 mg, sesuai dengan berat badan hewan coba. Namun, guna memberikan kemudahan dan kepastian peneliti dalam memberikan vitamin C, maka ditetapkan dosis vitamin C yang diberikan adalah 22 mg per tikus.

3.8.3.2 Perlakuan terhadap Hewan Coba

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 28-32⁰C. Tikus *Sprague Dawley* dipilih karena memiliki karakteristik fisiologis dan metabolisme mirip dengan manusia.

Seluruh sampel dikandangkan secara berkelompok di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Selama penelitian, *Sprague Dawley* mendapat pakan dan minum standar yang sama. Untuk adaptasi, selama 7 hari seluruh *Sprague Dawley* hanya diberi pakan dan minum standar *ad libitum*.

Pada hari ke-8, tikus *Sprague Dawley* dibagi secara acak kedalam 2 kelompok dan diberi perlakuan sebagai berikut:

- K : Tikus mendapat pakan standard dan air minum *ad libitum* dan paparan *heat stress* dengan suhu 43⁰C selama 70 menit.
- P : Tikus mendapat pakan standard dan air minum *ad libitum*. Tikus diberi vitamin C melalui sonde lambung dengan dosis 0.075 mg/g BB 2 jam sebelum dilakukan paparan *heat stress* pada suhu 43⁰C selama 70 menit dalam inkubator.

Kedua kelompok akan dipaparkan terhadap suhu 43⁰C selama 70 menit setelah dilakukan pemberian vitamin C 2 jam sebelumnya pada kelompok P. Setelah dilakukan pemaparan suhu 43⁰C selama 70 menit, dilakukan pengambilan sampel darah pada tiap kelompok. Darah diambil pada daerah *plexus retroorbital*.

3.8.3.3 Prosedur Pengambilan Darah Vena Tikus

Prosedur pengambilan darah vena pada *pleksus retroorbital* tikus dilakukan dengan cara sebagai berikut :

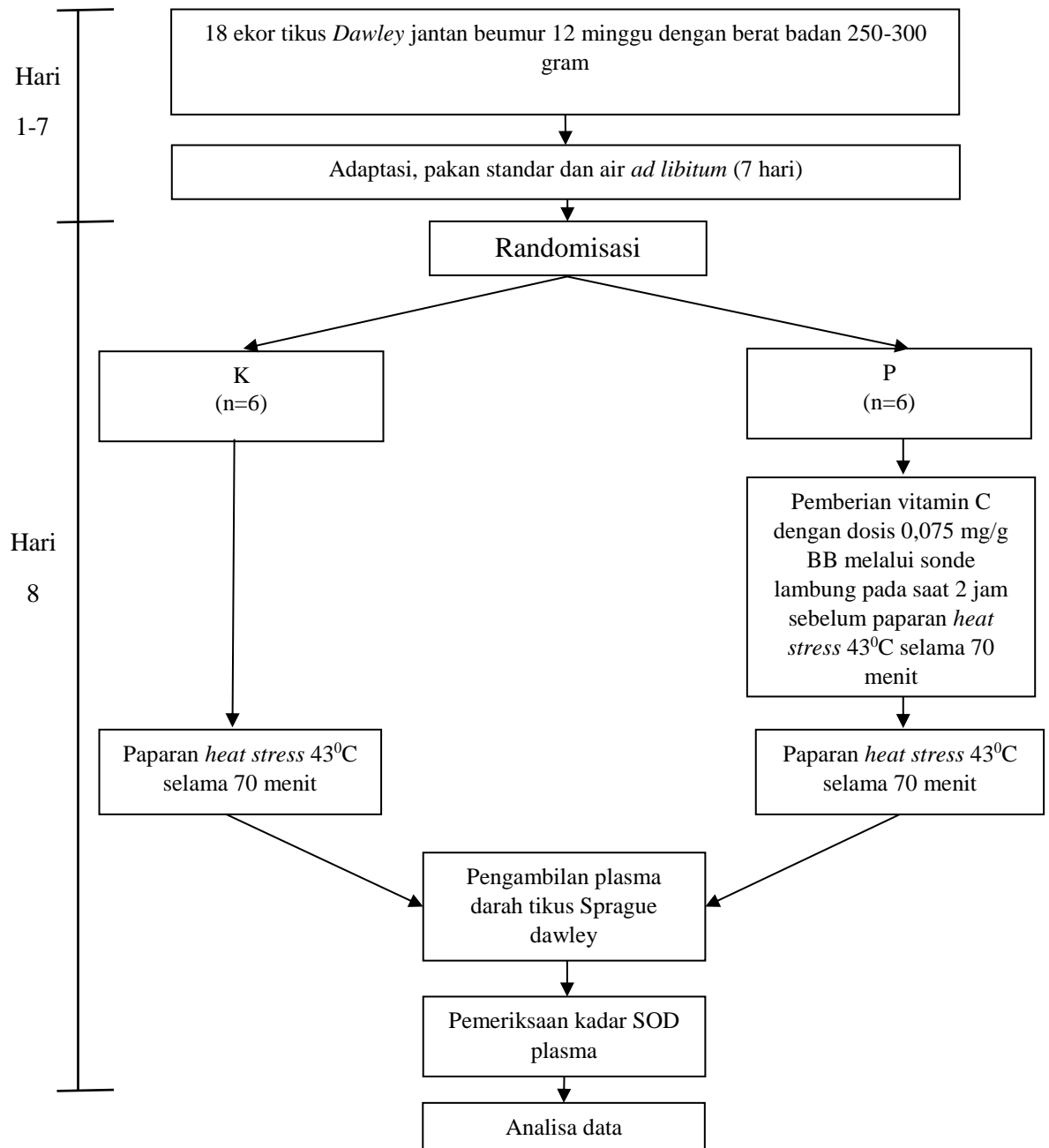
1. Tikus dianestesi dengan injeksi ketamin 50-150 mg/ kg BB kemudian dibaringkan menyamping sehingga salah satu sisi tikus menempel pada meja. Kemudian dilakukan fiksasi dengan ibu jari sehingga tangan dan kepala tikus menghadap ke bawah. Jari telunjuk menarik kulit di sekitar mata ke arah luar dengan sedikit penekanan agar bola mata mengalami protusi semaksimal mungkin. Perlu diperhatikan agar fiksasi ini tidak menekan saluran nafas tikus terlalu dalam.
2. Setelah didapatkan posisi yang baik, ambil pipet Pasteur / pipet hematokrit dan masukan ujungnya di sudut bawah *cavum orbita*. Arahkan pipet ini pada kemiringan 45° ke arah *medio superior cavum orbita* dan dorong sedikit ke dalam. Saat mendorong ke dalam, pipet agak diputar di antara jari.
3. Longgarkan penekanan agar darah lebih cepat masuk.
4. Setelah darah memasuki pipet dengan jumlah yang cukup, tutup bagian ujung terbuka pipet dengan jari sebelum benar-benar mencabut pipet tersebut dari *cavum orbita*. Hal ini dimaksudkan agar darah yang sudah masuk ke dalam pipet tidak keluar saat pencabutan.
5. Setelah pencabutan pipet selesai, biasanya perdarahan akan berhenti spontan dalam beberapa menit.

3.8.3.4 Pemeriksaan Kadar SOD

- 1) Alat dan bahan yang diperlukan dipersiapkan.

- 2) Standar dan sampel masing-masing 50uL standar dan sampel ditambahkan pada setiap sumur.
- 3) *Biotinylated Detection Ab* sebanyak 50uL ditambahkan pada setiap sumur.
- 4) Inkubasi selama 45 menit pada suhu 37⁰C.
- 5) Dilakukan aspirasi dan dicuci selama 3 kali.
- 6) *HRP conjugate* 100uL ditambahkan di setiap sumur dan dilakukan inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37⁰C.
- 7) Dilakukan aspirasi dan dicuci 5 kali.
- 8) *Substrate reagent* sebanyak 90uL ditambahkan dan dilakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰C.
- 9) *Stop Solution* sebanyak 50uL ditambahkan
- 10) Dilakukan pembacaan segera pada panjang gelombang 450nm dan didapatkan hasil kadar SOD plasma.

3.9 Alur penelitian



Gambar 10. Alur penelitian

3.10 Etika penelitian

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

3.11 Jadwal Penelitian

| No | Kegiatan | Bulan ke | | | | |
|----|---------------------------------|----------|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | Penyusunan proposal | ■ | | | | |
| 2 | Seminar proposal | | | | ■ | |
| 3 | Revisi proposal | | | | ■ | |
| 4 | <i>Ethical clearance</i> | | | | ■ | |
| 5 | Pelaksanaan penelitian | | | | | ■ |
| 6 | Pengolahan dan pengumpulan data | | | | | ■ |
| 7 | Penyusunan laporan hasil | | | | | ■ |
| 8 | Seminar penelitian | | | | | ■ |