

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data hanya dilakukan pada akhir penelitian setelah dilakukan perlakuan dengan membandingkan hasil kelompok yang diberikan perlakuan dengan kelompok yang tidak diberikan perlakuan (kontrol).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan selama bulan September-Desember 2015.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram. Sampel adalah jaringan hati tikus populasi yang telah diberikan perlakuan amoksisilin dosis toksik.

3.3.1.1 Kriteria Inklusi

- a) Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*.
- b) Sehat dan tidak memiliki kelainan anatomis (cacat).
- c) Berusia 6-7 minggu.
- d) Memiliki berat 100-200 gram.

3.3.1.2 Kriteria Eksklusi

- a) Tikus sakit sebelum dilakukan penelitian.
- b) Tikus mati sebelum dilakukan penelitian.

3.3.1.3 Kriteria *Drop Out*

- a) Tikus mati selama diberikan perlakuan.
- b) Tikus tampak sakit selama diberikan perlakuan.

3.3.2 Besar Sampel

Pada uji eksperimental rancangan acak lengkap, besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer yaitu $(t)(n-1) \geq 15$, (t) adalah jumlah kelompok perlakuan, (n) jumlah ulangan pada masing-masing kelompok

$$(t)(n-1) \geq 15$$

$$(9)(n-1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,67$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 3 ekor tikus untuk tiap kelompok. Untuk menghindari dropout, ditambahkan 1 ekor tikus tiap kelompok sehingga jumlah sampel adalah 4 ekor tiap kelompok.

Dalam penelitian ini digunakan 36 tikus yang terbagi dalam 9 kelompok (masing masing kelompok terdiri dari 4 ekor) yaitu :

- a. Kelompok kontrol negatif (kelompok PKN) adalah kelompok tikus dengan pemberian aquades 1 ml setiap hari selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
- b. Kelompok kontrol positif A (kelompok PKA) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik A dengan dosis yaitu 10 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung (Adesanoye *et al.*, 2014).
- c. Kelompok kontrol positif B (kelompok PKB) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik bermerek B dengan dosis 10 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung (Adesanoye *et al.*, 2014).
- d. Kelompok perlakuan PA1 (obat A) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik dosis 102,8 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan frekuensi 3

- kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
- e. Kelompok perlakuan PA2 (obat A) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik dosis 205,6 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
 - f. Kelompok perlakuan PA3 (obat A) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik dosis 411,2 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
 - g. Kelompok perlakuan PB1 (obat B) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik bermerek dosis 102,8 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
 - h. Kelompok perlakuan PB2 (obat B) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik bermerek dosis 205,6 mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.
 - i. Kelompok perlakuan PB3 (obat B) adalah kelompok tikus dengan pemberian amoksisilin generik bermerek dosis 411,2

mg/kg BB dalam 1 ml dengan aquades selama 14 hari dengan dengan frekuensi 3 kali per hari diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan adalah sonde lambung, neraca analitik, mikropipet volume 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, *mikrotube* 1.5 mL dan 2 mL, *micropestle*, *freezer* -80°C, spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 210 nm, *vortex*, alat sentrifugasi, kuvet kaca, aluminium foil, sarung tangan karet, alat tulis, dan alat laboratorium lain seperti gelas kimia, pipet, pinset, sendok, labu ukur, batang pengaduk, alat bedah minor, dan tabung reaksi.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah Organ hati tikus yang diberikan perlakuan, H₂O₂ 30%, PBS 0.05 pH 7, PBS 0.1 pH 7.4, *bovine serum albumin* (BSA), *aquadest*, amoksisilin generik bermerek, dan amoksisilin generik.

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : dosis amoksisilin generik berlogo dan bermerek.

Variabel terikat : aktivitas spesifik enzim katalase jaringan hati tikus.

3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Tabel 1. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi	Skala
Dosis toksik amoksisilin generik berlogo	Ada 3 kelompok dengan pemberian dosis amoksisilin generik berlogo yang menyebabkan stres oksidatif pada jaringan hati tikus, yaitu ; <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok kontrol A (PKA) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 10 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung (Adesanoye <i>et al.</i>, 2014). 2. Kelompok perlakuan A-1 (PA1) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 3. Kelompok perlakuan A-2 (PA2) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 4. Kelompok perlakuan A-3 (PA3) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 	Numerik
Dosis toksik amoksisilin generik bermerek	Ada 3 kelompok dengan pemberian dosis amoksisilin generik bermerek yang menyebabkan stres oksidatif pada jaringan hati tikus yaitu : <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok kontrol B (PKB) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 10 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung (Adesanoye <i>et al.</i>, 2014). 2. Kelompok perlakuan B-1 (PB1) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik bermerek B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 3. Kelompok perlakuan B-2 (PB2) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik bermerek B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 4. Kelompok perlakuan B-3 (PB3) adalah kelompok tikus yang diberikan amoksisilin generik bermerek B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB dalam 1 ml aquades tikus diberikan secara per oral menggunakan sonde lambung. 	Numerik
Aktivitas enzim katalase	Katalase adalah antioksidan enzimatik umum. Katalase salah satu enzim yang dapat ditemukan di hati terutama pada peroksisom. Aktivitas spesifik katalase dihitung berdasarkan penguraian H ₂ O ₂ dan O ₂ pada panjang gelombang 210 nm. Dekomposisi H ₂ O ₂ diamati secara spektrofotometri, dan pengukuran dilakukan pada pH 7,0 (Susantiningasih, 2015). Peningkatan aktivitas katalase hepatic dapat dijelaskan sebagai respon dari hati terhadap tingginya kadar ROS (Lukaszewicz-Hussain dan Moniuszko-Jakoniuk, 2004)	Numerik

3.6 Cara Kerja

Penelitian diawali dengan uji pendahuluan untuk melihat apakah dosis maksimum dapat digunakan sebagai dosis toksik. Jika dosis maksimum menunjukkan kerusakan yang bermakna, maka penelitian dilanjutkan dengan menggunakan prinsip $\frac{1}{2}$ -1-2 kali dosis toksik dengan populasi tikus yang sama dengan pengulangan sesuai rumus frederer. Jika tidak terdapat kerusakan yang bermakna, maka 2 kali dosis maksimum akan dibuat menjadi 3 variasi kembali menggunakan prinsip $\frac{1}{2}$ -1-2 kali dosis toksik dengan pengulangan sesuai dengan rumus frederer dengan mengikuti prosedur dibawah ini (Arome dan Chinedu, 2014).

3.6.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus percobaan diadaptasikan selama satu minggu. Kemudian dilakukan penyeragaman cara hidup dan makanan sebelum dilakukan percobaan. Tikus diberi makanan makanan dan minuman secara *ad libitum*. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, dan suhu kandang dijaga sekitar 25⁰C sesuai dengan suhu ruangan. Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Kesehatan tikus dipantau setiap hari dan berat badan tikus ditimbang setiap minggu sampai tikus diterminasi (Ratya, 2014).

3.6.2 Perhitungan Dosis

Pada penelitian ini, penulis menggunakan 2 jenis obat amoksisilin yaitu tipe generik dan generik bermerek yang dipilih secara acak dan terdapat di apotek di Bandar Lampung. Dosis amoksisilin yang digunakan merupakan dosis maksimum untuk manusia yaitu 1000 mg yang dikonversikan menjadi dosis toksik tikus menggunakan rumus BSA (*Body Surface Area*) yang terangkum pada rumus dibawah ini (Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

$$\text{HED} \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right) = \text{dosis hewan coba} \times \frac{Km \text{ hewan coba}}{Km \text{ manusia}}$$

HED (*Human Equivalent Dose*) merupakan dosis yang digunakan pada manusia. Satuan yang digunakan dalam HED berupa mg/kg BB (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Berat badan yang digunakan sebagai pembagi merupakan rerata berat badan manusia yang digunakan dalam konversi HED, yaitu 60 Kg. Sehingga jumlah HED amoksisilin sebesar :

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{dosis obat} / \text{berat badan}$$

$$\text{HED (mg/kg)} = 1000 \text{ mg} / 60 \text{ kg}$$

$$\text{HED (mg/kg)} = 16,67 \text{ mg/kg}$$

HED yang didapat dikonversikan ke dosis hewan coba menggunakan rumus BSA. Pada rumus BSA, *Km* berperan sebagai konstanta (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). *Km* untuk manusia dewasa normal sebesar 37 dan *Km* untuk hewan coba (tikus) sebesar 6. Sehingga didapat dosis hewan coba sebesar :

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{dosis hewan} \times (\text{Km hewan coba} / \text{Km manusia})$$

$$16,67 \text{ mg/kg} = \text{dosis hewan coba} \times 6/37$$

$$\text{Dosis hewan coba} = 37 \times 16,67 \text{ mg/kg}$$

$$\text{Dosis hewan coba} = 102,79 \text{ mg/kg}$$

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 102,79 mg/kg dan dibulatkan menjadi 102,8 mg/kg BB. Dosis tikus dibuat menjadi 3 variasi dosis menggunakan prinsip $\frac{1}{2}$ -1-2 kali dosis tersebut sehingga didapatkan dosis yaitu 51,4 mg/kg BB, 102,8 mg/kg BB dan 205,6 mg/kg BB.

3.6.3 Perlakuan Induksi dengan Amoksisilin

Setelah 1 minggu aklimatisasi hewan coba atau tikus putih. Tikus diberikan perlakuan dengan amoksisilin sesuai variasi dosis kelompoknya baik amoksisilin generik berlogo maupun generik bermerek dengan dosis 102,8 mg/kgBB tikus, 205,6 mg/kgBB tikus dan 411,2 mg/kgBB tikus, masing masing dalam 1 ml dengan aquades dengan frekuensi 3 kali per hari selama 14 hari pada kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok diberikan amoksisilin secara per oral menggunakan sonde lambung. Hal tersebut bertujuan agar dosis amoksisilin yang diberikan sesuai.

3.6.4 Terminasi dan Penyimpanan

Setelah perlakuan induksi pada setiap kelompok selama 14 hari, tikus diterminasi dengan anastesi menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75-100mg/kg : 5-10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara Intra peritoneal, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation* dan dilakukan laparotomi untuk mengambil organ hati (Leary *et al.*, 2013).

Berat hati masing-masing tikus ditimbang dan dicatat. Hati ditempatkan ke dalam wadah steril pada suhu -4°C dan disimpan di dalam *freezer* (-80°C) sampai dilakukan pembuatan homogenat. (Susantiningsih, 2015).

3.6.5 Pembuatan Homogenat Sampel

Sampel jaringan hati diambil dari *upright freezer* lalu dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu -4°C selama 1 hari. Sampel jaringan yang telah diambil kemudian dipotong dan ditimbang sebanyak 100 mg. Homogenat dibuat dengan menambahkan PBS 0,1 M dengan PH 7.4 sebanyak 0,5 mL pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan *vortex* dan *micropleste*. Homogenat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Lalu supernatan dipisahkan dari pelet. Pindahkan supernatan

ke testube kosong dan simpan pada suhu -20°C (Susantiningsih, 2015).

3.6.6 Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh blanko dan sample setiap menit selama 2 menit. Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan memasukan 950 μl larutan H_2O_2 ke dalam kuvet dengan pengenceran optimal adalah 1:4000 (Febrianti, 2009). Kemudian ditambahkan dengan 50 μl PBS 0.05 M dengan pH 7, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokkan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang 210 nm. Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 μL sampel ditambahkan pada 950 μL H_2O_2 dengan pengenceran 1:4000, untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko. Selanjutnya penguraian H_2O_2 , baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangi absorbansi di awal (t_1) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi setiap menit sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Kemudian hasil pengamatan dicatat (Susantiningsih, 2015).

Seluruh sampe diukur dengan prinsip triplet (tiga kali pengukuran untuk menghindari kesalahan dalam perhitungan).

3.6.7 Penentuan Kurva Standar Protein

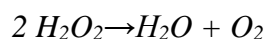
Untuk menentukan kurva standar protein, 50 mg BSA ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:1. Kemudian larutan BSA diencerkan dengan perbandingan 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, dan 0,8 dan diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm. Hasil aktivitas spesifik pengukuran dicatat dalam tabel dan dibuat kurvanya. Dari kurva tersebut dicari rumus untuk menghitung konsentrasi protein jaringan.

3.6.8 Penentuan Konsentrasi Protein Hati

Untuk menentukan konsentrasi protein pada hati, dilakukan pengukuran absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada pengenceran optimal pada 1:100 (Putri, 2009). Dengan panjang gelombang 210 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel. Konsentrasi protein (mg/ml) hati kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel.

3.6.9 Penentuan Aktivitas Katalase

Katalase adalah antioksidan enzimatik yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan molekul O_2 .



Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum.

Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7,0 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase.

Perhitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut (Susantiningsih, 2015):

$$\text{Aktivitas Katalase (U/ml)} = \frac{((\Delta \text{Absorbansi Uji} - \Delta \text{Absorbansi Blanko}) / \text{menit} \times \text{faktor pengencer})}{((\text{molaritas H}_2\text{O}_2) \times (\text{volume sampel yang diukur}))}$$

Hasil perhitungan tersebut kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase (U/mg). semua hasil dicatat dalam tabel.

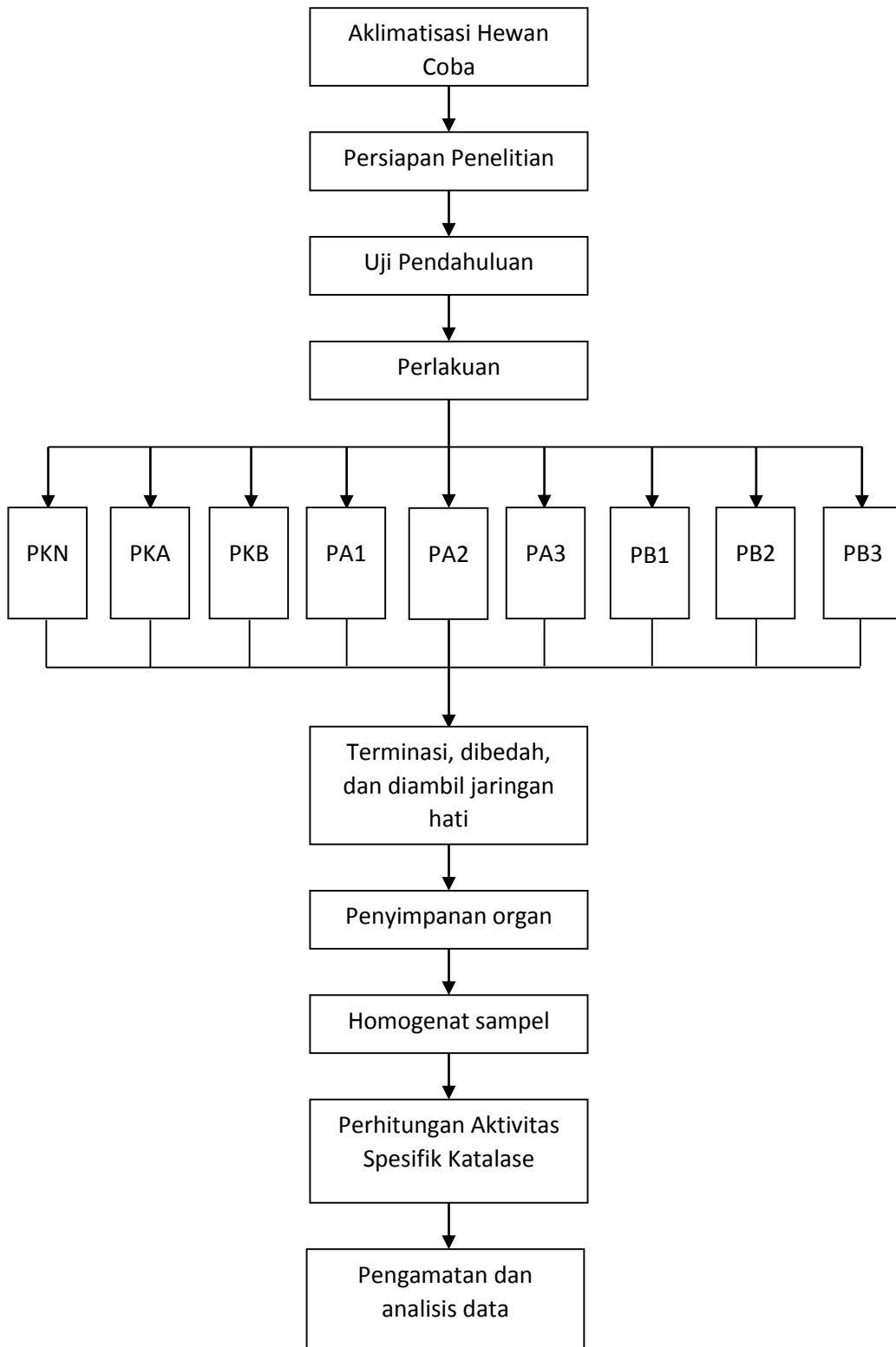
$$\text{Aktivitas spesifik katalase (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Katalase (U/mL)}}{\text{Kadar Protein dalam Sampel (mg/mL)}}$$

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan dan analisis dengan membandingkan rerata aktivitas enzim katalase antara kelompok. Analisis data yang digunakan adalah analisis univariat dan analisis bivariat. Analisis univariat dilakukan untuk menilai apakah data yang didapat memiliki distribusi normal atau tidak. Analisis univariat yang digunakan adalah uji normalitas Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah sampel kurang dari 50. Analisis bivariat dilakukan menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* apabila varians data berdistribusi normal dan homogen, namun apabila distribusi data tidak normal dan tidak homogen

dilanjutkan dengan analisis non-parametrik uji *Kruskal-Wallis*. Jika pada uji *One Way ANOVA* memberikan hasil $p < 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna) maka akan dilakukan dengan analisis *post-hoc* LSD untuk menilai kebermaknaan antar kelompok. Apabila pada uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan kebermaknaan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3.8 Diagram Alir



Gambar 3. Diagram alir

3.9 Etika Penelitian

Ethical clearance untuk penelitian ini akan didapatkan dari Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan akan mengajukan *ethical approval* ke Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan mengikuti prinsip 3R yaitu *replacement*, *reduction* dan *refinement*, dan menggunakan prinsip 5F yaitu *freedom of hunger and thirst*, *freedom of discomfort*, *freedom of pain*, *freedom to express natural behavior* dan *freedom of distress*.