

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data akan dilakukan pada akhir penelitian setelah masing-masing kelompok hewan coba diberi perlakuan dan diterminasi.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama September hingga Desember 2015.

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi

Populasi adalah *Rattus norvegicus* berusia 6 – 7 minggu dengan berat 100 – 200 g. Hewan coba didapat dari Institut Pertanian Bogor. Hewan ini dipilih karena memiliki metabolisme yang mirip dengan manusia,

ukurannya kecil dan perilakunya tidak agresif (Hayes dan Kruger, 2014).

3.3.2. Kriteria Inklusi

Adapun kriteria inklusi sampel adalah sebagai berikut.

- a. *Rattus norvegicus* jantan
- b. Sehat (aktif, rambut tidak kusam, rontok atau botak)
- c. Tidak memiliki kelainan anatomis
- d. Memiliki berat 100 – 200 g
- e. Berumur 6 – 7 minggu

3.3.3. Kriteria Eksklusi

Adapun kriteria eksklusi sampel adalah sebagai berikut.

- a. Tikus mati sebelum mendapatkan perlakuan

3.3.4. Kriteria Drop Out

Adapun kriteria *drop out* sampel adalah sebagai berikut.

- a. Tikus mati selama mendapatkan perlakuan

3.3.5. Besar Sampel

Besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan menggunakan rumus Federer, yaitu:

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

dengan t adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok.

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

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 4 ekor *Rattus norvegicus* untuk tiap kelompok. Maka, penelitian akan menggunakan 28 ekor *Rattus norvegicus* jantan yang dibagi dalam 7 kelompok yang masing masih terdiri dari 4 ekor dengan rincian sebagai berikut.

- a. Kelompok kontrol negatif (K), yaitu tikus yang hanya diberi akuades sehari tiga kali selama 14 hari.
- b. Kelompok generik-1 (A1), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik berlogo 102,8 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.
- c. Kelompok generik-2 (A2), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik berlogo 205,6 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.
- d. Kelompok generik-3 (A3), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik berlogo 411,2 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.

- e. Kelompok *branded-1* (A1), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik bermerek 102,8 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.
- f. Kelompok *branded-2* (B2), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik bermerek 205,6 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.
- g. Kelompok *branded-3* (B3), yaitu tikus yang diberi amoksisilin generik bermerek 411,2 mg/kgBB sehari tiga kali selama 14 hari.

3.4. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1. Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Variabel terikat, yaitu kadar malondialdehid (MDA) hepar *Rattus norvegicus*
- b. Variabel bebas, yaitu amoksisilin generik berlogo dan amoksisilin generik bermerek

3.4.2. Definisi Operasional

Definisi operasional ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Amoksisilin Generik Berlogo	<p>Pemberian dosis toksik amoksisilin generik berlogo sehari tiga kali selama 14 hari. Sediaan obat berbentuk pulveres yang akan dilarutkan dalam 1 cc akuades dan diberikan menggunakan sonde lambung. Rincian dosis masing-masing kelompok penelitian adalah sebagai berikut.</p> <ol style="list-style-type: none"> Kelompok generik-1 (A1) diberikan dengan dosis 102,8 mg/kgBB sehari tiga kali. Kelompok generik-2 (A2) diberikan dengan dosis 205,6 mg/kgBB sehari tiga kali. Kelompok generik-3 (A3) diberikan dengan dosis 411,2 mg/kgBB sehari tiga kali. 	Ditimbang menggunakan neraca	Dosis obat (mg)	Numerik
Amoksisilin Generik Bermerek	<p>Pemberian dosis toksik amoksisilin generik bermerek sehari tiga kali selama 14 hari. Sediaan obat berbentuk pulveres yang akan dilarutkan 1 cc dalam air dan diberikan menggunakan sonde lambung. Rincian dosis masing-masing kelompok penelitian adalah sebagai berikut.</p>	Ditimbang menggunakan neraca	Dosis obat (mg)	Numerik

Tabel 1. lanjutan

Kadar malondial-dehid (MDA) hepar <i>Rattus norvegicus</i>	<p>a. Kelompok <i>branded-1</i> (B1) diberikan dengan dosis 102,8 mg/kgBB sehari tiga kali.</p> <p>b. Kelompok <i>branded-2</i> (B2) diberikan dengan dosis 205,6 mg/kgBB sehari tiga kali.</p> <p>c. Kelompok <i>branded-3</i> (B3) diberikan dengan dosis 411,2 mg/kgBB sehari tiga kali.</p>	Dibaca pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 530 nm	Kadar MDA (nmol/mg)	Numerik
	Kadar MDA dihitung dari jaringan hepar <i>Rattus norvegicus</i> yang sudah diterminasi setelah perlakuan selama 14 hari. Kadar MDA dibandingkan antara kelompok kontrol, kelompok amoksisilin generik berlogo, dan kelompok amoksisilin generik bermerek.			

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah *mortar*, *pestle*, *Beaker glass*, *pot*, neraca, sonde lambung, alat bedah minor, alat sentrifugasi, *microtube* ukuran 2 ml, vorteks, *micropestle*, *micropipet*, *microtip* putih, *microtip* kuning, *microtip* biru, spektrofotometer, *freezer*, *waterbath*, *aluminium foil*, spuit, kandang, sekam, tempat minum dan makanan tikus.

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah *Rattus norvegicus* jantan, akuades, amoksisilin generik berlogo, amoksisilin generik bermerek, *ketamine:xylazine*, larutan asam trikloroasetat (TCA) 20%, larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67%, larutan standar tetraetoksipropan (TEP) 1:80.000, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0,1 M.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba akan diaklimatisasi selama 7 hari dengan maksud menyeragamkan cara hidup dan pola makan sebelum dilakukan induksi. Hewan coba akan diletakkan di dalam kandang plastik ditutup kawat beralas sekam dan dipisahkan berdasarkan kelompok masing-masing. Kesehatan hewan coba akan dipantau setiap hari. Makanan berupa sekam dan minum disediakan oleh peneliti.

3.6.2. Perhitungan Dosis Amoksisilin

Penelitian ini menggunakan amoksisilin generik berlogo dan generik bermerek yang didapat dari apotek di Bandar Lampung. Dosis yang diberikan adalah dosis maksimal per hari terhadap manusia yaitu sebesar 3000 mg (Tjay dan Rahardja, 2007). Dosis dibagi menjadi tiga kali pemberian, masing-masing 1000 mg. Dosis manusia dikonversi

menjadi dosis yang tepat untuk hewan coba menggunakan rumus BSA (*Body Surface Area*) sebagai berikut.

$$\text{HED} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Dosis hewan} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times Km \frac{\text{hewan}}{\text{manusia}}$$

Keterangan :

HED = *Human Equivalent Dose*

Km = konstanta (Manusia dewasa= 37; tikus= 6) (Reagan-shaw *et al.*, 2007)

Dengan demikian, perhitungan dosis antibiotik dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

HED = mg/kg

HED = 1000/60

HED = 16,67 mg/kg

HED = dosis hewan x 6/37

16,67 = 6/37 dosis hewan

Dosis hewan = 102,79 mg/kg

Dosis akan diberikan secara bertingkat kepada setiap kelompok perlakuan dengan kelipatan 1,2, dan 4 kali dosis.

3.6.3. Induksi Stres Oksidatif dengan Amoksisilin

Setelah 7 hari aklimatisasi hewan coba, *Rattus norvegicus* diberikan amoksisilin sesuai takaran dosis masing-masing kelompok sampel selama 14 hari secara peroral menggunakan sonde lambung.

Kelompok kontrol negatif, yaitu K, tidak diberikan amoksisilin, melainkan diberi akuades sehari tiga kali. Kelompok A1 dan B1

diberikan amoksisilin 1 kali dosis, yaitu sebesar 102,8 mg/kgBB sehari tiga kali. Kelompok A2 dan B2 diberikan amoksisilin 2 kali dosis, yaitu sebesar 205,6 mg/kgBB sehari tiga kali. Kelompok A3 dan B3 diberikan amoksisilin 4 kali dosis, yaitu sebesar 411,2 mg/kgBB sehari tiga kali.

3.6.4. Terminasi Hewan Coba

Terminasi dilakukan setelah perlakuan hewan coba selama 14 hari. Tikus dianestesi menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75-100mg/kg : 5-10 mg/kg secara intraperitoneal. Setelah dianestesi, hewan coba diterminasi dengan metode *cervical dislocation*. *Cervical dislocation* dapat diterapkan untuk terminasi hewan coba dengan berat < 200 g (Leary *et al.*, 2013).

3.6.5. Pengambilan Organ

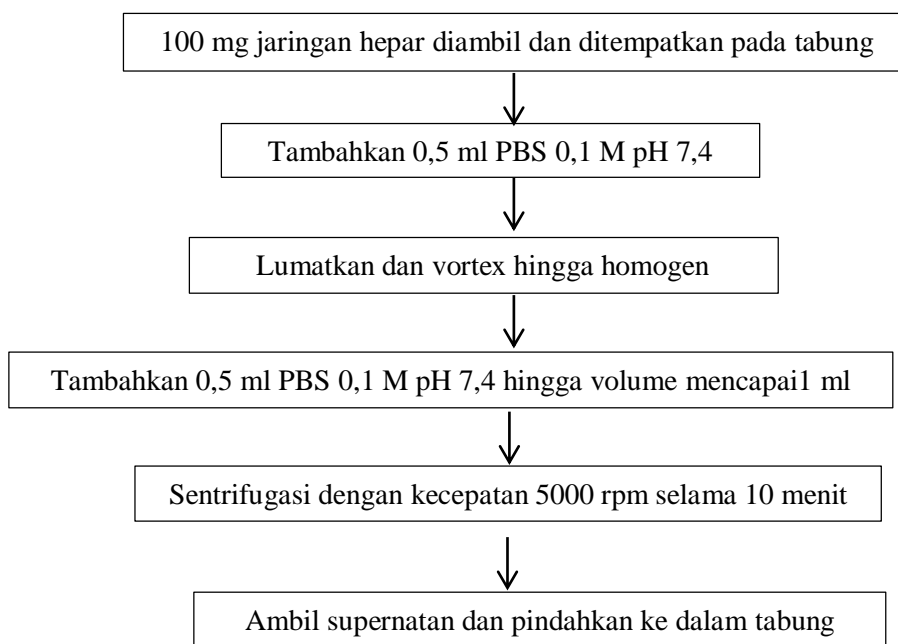
Hepar hewan coba diambil setelah dilakukan terminasi. Pembuatan homogenat hepar dilakukan segera setelah terminasi untuk mengurangi kemungkinan bias kadar MDA yang akan diteliti.

3.6.6. Pembuatan Homogenat Jaringan Hepar

Hepar hewan coba diambil sebanyak 100 mg dan ditempatkan dalam tabung. Tambahkan ke dalamnya sebanyak 0,5 ml *phosphate buffer saline* (PBS) 0,1 M pH 7,4. Campuran kemudian divorteks dan dilumatkan hingga homogen. Tambahkan lagi sebanyak 0,5 ml PBS 0,1

M pH 7,4 hingga volume campuran mencapai 1 ml. Selanjutnya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Ambil supernatan dan masukkan ke dalam tabung baru. Supernatan dapat disimpan pada suhu -20° celcius.

Berikut ini adalah alur pembuatan homogenat jaringan hepar.



Gambar 5. Alur Pembuatan Homogenat Jaringan Hepar (Ratya, 2014).

3.6.7. Pengukuran kadar Malondialdehid

Pengukuran kadar MDA akan dilakukan sesuai dengan metode Wills. Langkah pertama adalah pembuatan larutan standar yang akan dibaca pada elektrofotometer untuk mengetahui kurva standar. Larutan standar dibuat melalui pengenceran tetraetoksipropan (TEP) 1:80.000 dengan akuades sebanyak 400 μ l lalu ditambahkan larutan trikloroasetat (TCA) 20% sebanyak 200 μ l. Campuran ini divortex hingga homogen dan

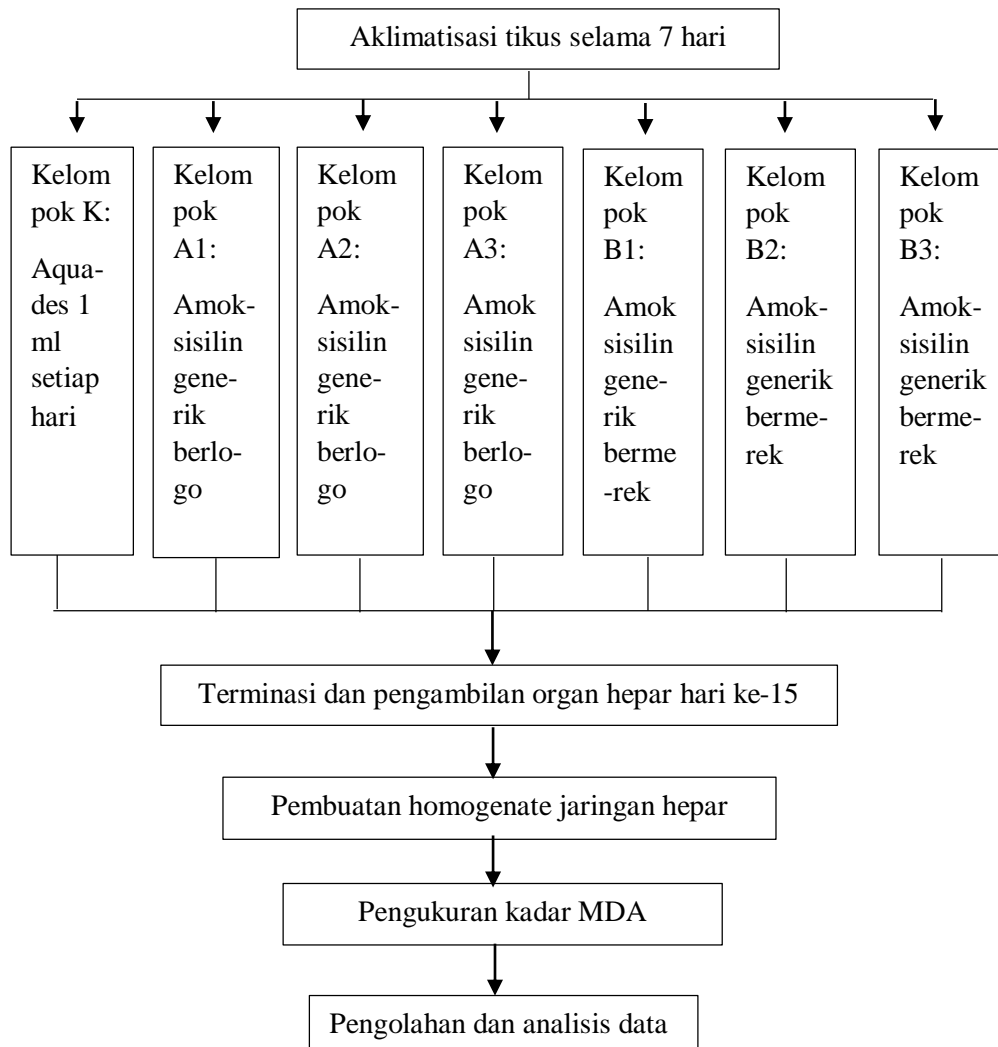
disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian diambil dan dipindahkan ke dalam tabung lain. Tambahkan larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% sebanyak 400 µl. Selanjutnya, inkubasi pada penangas air 95°C selama 10 menit lalu dinginkan selama 5 menit. Baca larutan tersebut pada panjang gelombang 530 nm.

Setelah membaca larutan standar, barulah dilakukan pengukuran MDA kelompok-kelompok penelitian. Ambil ke dalam tabung sebanyak 200µl supernatan ditambahkan 200 µl akuades dan 200 µl larutan TCA 20%. Campuran divorteks hingga homogen dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung baru. Tambahkan 400 µl larutan TBA 0,67%. Selanjutnya, inkubasi pada penangas air 95°C selama 10 menit lalu dinginkan hingga suhu ruang selama 5 menit. Baca larutan hasil pada panjang gelombang 530 nm (Ratya, 2014).

3.7. Diagram Alir

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari dan diberi perlakuan selama 14 hari. Hewan coba diterminasi pada hari ke-15 dan diambil heparnya untuk dilakukan prosedur pemeriksaan kadar MDA.

Proses penelitian digambarkan pada diagram alir berikut.



Gambar 6. Diagram Alir Penelitian

3.8. Pengolahan dan Analisis Data

3.8.1. Uji Normalitas Data

Data hasil penelitian akan diuji normalitas datanya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50 (Dahlan, 2013).

3.8.2. Uji Homogenitas Varians

Data hasil penelitian akan diuji homogenitas variansnya menggunakan uji *Levene* (Dahlan, 2013).

3.8.3. Uji Hipotesis

Data hasil penelitian akan dilakukan uji hipotesis numerik lebih dari 2 kelompok tidak berpasangan. Jika data yang berdistribusi normal akan diuji dengan *One Way ANOVA*, sedangkan uji alternatifnya adalah dengan uji *Kruskal-Wallis* (Dahlan, 2013).

3.8.4. Uji *Post Hoc*

Data hasil penelitian akan dianalisis untuk mengetahui perbedaan antar kelompok secara lebih rinci. Jika hasil uji *One Way ANOVA* akan dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc LSD*, sedangkan hasil uji *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U* (Dahlan, 2013).

3.9. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2444/UN26/8/DT/2015 (terlampir). Hewan coba yang digunakan akan diperhatikan kenyamanannya (*comfort*); diberi makan, minum, dan tempat tinggal yang layak dan lingkungan yang terjaga kebersihannya. Peneliti akan meminimalisir ketidaknyamanan (*discomfort*) dan rasa sakit (*pain*). Terminasi hewan coba akan dilakukan dengan metode *euthanasia* yang sesuai (The American Physiological Society, 2002).