

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium murni, dengan rancangan penelitian *pretest-posttest control group design*.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di LP3HP-LPPT UGM.
- b. Pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan antara bulan Mei-Desember 2007 (terlampir)

C. Populasi dan Sampel

Penelitian menggunakan hewan uji tikus putih strain wistar diperoleh dari LP3HP-LPPT UGM. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan kriteria inklusi :

1. Umur 2 bulan.

2. Berat 150-200 gr.
3. Jenis kelamin jantan.

Jumlah sampel penelitian ini sebanyak 15 ekor, dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari 5 ekor tikus. Tiap kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut :

1. Kelompok A, diberikan vitamin C no-merk 9 mg (konfersi dosis pada tikus) selama 10 hari
2. Kelompok B, diberikan vitamin E no-merk 0,5 mg (konfersi dosis pada tikus) selama 10 hari.
3. Kelompok C (kontrol negatif), hanya diberikan aquadest selama 10 hari.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Vitamin C dan vitamin E yang diberikan pada tikus dengan dosis tertentu.

2. Variabel Terikat

kadar AGEs masing-masing sampel

3. Variabel terkontrol

- a. Usia : diatasi dengan pemilihan subyek penelitian yang memiliki usia sekitar 2 bulan.
- b. Jenis kelamin : diatasi dengan pemilihan subyek dari jenis kelamin yang sama yaitu jantan.
- c. Berat badan : diatasi dengan pemilihan subyek yang memiliki berat

badan antara 150-200 gram.

- d. Dipelihara dalam kandang khusus dengan pakan dan kondisi kandang yang sama.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Antioksidan

a. Vitamin C

Vitamin C nomerk yang diberikan pada kelompok perlakuan A sebanyak 9 mg perhari (konversi dosis pada tikus) selama 10 hari. Ini merupakan dosis yang di anjurkan pada keadaan stress oksidatif.

b. Vitamin E

Vitamin E nomerk diberikan pada kelompok perlakuan B sebanyak 0.5 mg perhari (konversi dosis pada tikus) selama 10 hari.

2. AGEs

AGEs merupakan produk akhir dari reaksi glikosilasi antara glukosa dan gugus amin dari protein yang akan terbentuk dalam waktu 24-48 jam setelah paparan glukosa yang tinggi pada darah.

F. Instrumen Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Alat penelitian

a. Gelas beker

- b. Tabung reaksi
 - c. Sentrifuge
 - d. Vortex mixer
 - e. Spektrofotometer microlab 300
 - f. Mikro pipet
2. Bahan Penelitian
- a. Buffer fosfat 1M pH 7,4
 - b. Vitamin C no-merk 9 mg
 - c. Vitamin E no-merk 0,5 mg
 - d. Darah tikus 1,5 ml
 - e. Alloxan
 - f. Aquadest
 - g. Antikoagulan EDTA

G. Cara Kerja

1. Sampel penelitian 15 ekor tikus putih homogen dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 5 ekor.
2. Sebelum pengambilan darah, hewan uji dipuasakan selama 8-12 jam.
3. Diambil darah awal pada hewan uji sebanyak 1,5 ml dan diperiksa kadar AGEs untuk melihat kadar AGEs normal.
4. Setelah itu, hewan uji diberi alloxan (bahan kimia untuk menaikkan kadar glukosa darah).

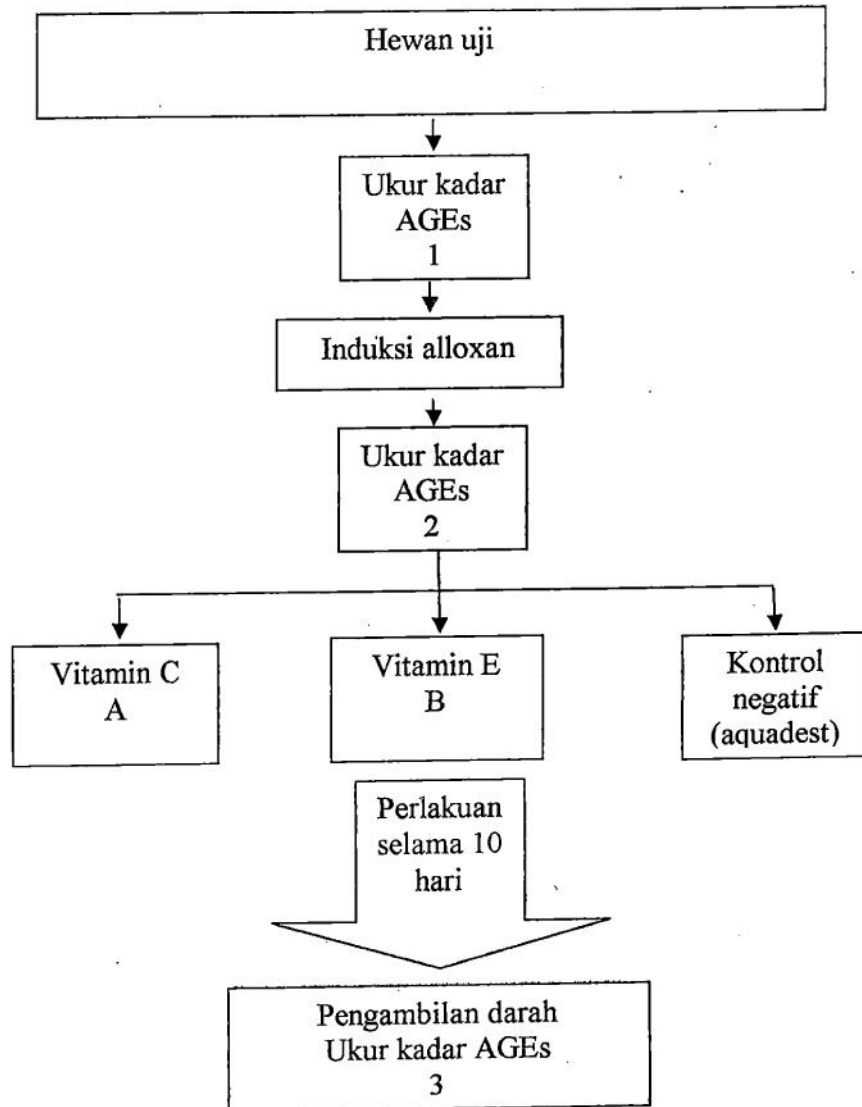
5. hewan uji dibiarkan selama 48 jam, kemudian dilakukan pengambilan darah kembali untuk mengukur kadar AGEs
6. Subyek pada kelompok A diberi vitamin C, masing-masing 9 mg setiap hari selama 10 hari. Subyek pada kelompok B diberi vitamin E masing-masing 0,5 mg perhari selama 10 hari. Pada kelompok kontrol negatif tidak diberi antioksidan hanya diberi aquades.
7. Pemeriksaan kadar AGEs setelah tiap subyek diberi perlakuan selama 10 hari
8. Analisis Statistik

H. Pengukuran absorbansi AGEs

Absorbansi AGEs diukur setelah hari ke-10. Darah tikus direaksikan dengan Buffer fosfat pH 7,4 dan aquadest dalam tabung reaksi, dicampur dengan membolak-balikkan tabung, diambil 0,5 ml dari tiap larutan uji. Kemudian kadarnya diukur dengan menggunakan spektrofotometer, panjang gelombang 340 nm.

I. Analisis Data

Data yang didapat pada penelitian kali ini di proses menggunakan program komputer. Data hasil pengukuran dianalisis dengan uji ANOVA satu jalan kemudian dilanjutkan dengan t-Test.



Gambar 4. Bagan cara penelitian