

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental murni *post test control group design* dengan rancangan acak lengkap (RAL).

Table 3.1 Desain Penelitian 1

Kelompok	Hari	
	1	14
N	EG 0,75% v/v+P	EG 0,75% v/v
T 10 mg/KgBB	EG 0,75% v/v+P	EG 0,75% v/v + P + T 10 mg/KgBB
C 25 mg/KgBB	EG 0,75% v/v+P	EG 0,75% v/v + P + C 25 mg/KgBB
E 15 mg /KgBB	EG 0,75% v/v+P	EG 0,75% v/v + P + E 15 mg/KgBB
K 1 kapsul/KgBB	EG 0,75% v/v+P	EG 0,75% v/v + P + K 1 kapsul/KgBB

Keterangan :

EG : Etilen Glikol

E : vitamin E

T : Thiamin (vitamin B1)

K : Kamil herbal *three in one*

C : captopril

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo Ungaran. Hal ini dikarenakan alat dan bahan yang memadai untuk dilakukan penelitian tersebut.

C. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah serum hewan uji tikus putih jantan galur wistar. Teknik sampling yang digunakan adalah cara acak (Random sampling).

Jumlah sampel penelitian masing-masing kelompok ditentukan dengan menggunakan rumus Federer (Marlina dan Probosari, 2012).

Keterangan:

n = jumlah kelompok

t = kelompok sampel

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15+4$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Pada penelitian ini digunakan 5 kelompok (k-5). Sampel yang digunakan berasal dari 25 ekor tikus kemudian dibagi acak menjadi 5 kelompok masing masing terdiri dari 5 ekor tikus.

D. Definisi Operasional

Table 3.2 Definisi Operasional 1

Variable bebas	Definisi	Alur/ cara	Hasil	Ratio
1	Thiamin adalah obat yang diberikan pada tikus nefrolithiasis yang di induksi EG, dosis 10 mg/kgBB diberikan 0,18 mg/ 3 ml per oral.	-	-	-
2	Captopril adalah obat yang diberikan pada tikus nefrolithiasis yang di induksi EG, dengan dosis 25 mg /kgBB diberikan 0,45 mg/ 3 ml per oral.	-	-	-
3	Vitamin E adalah obat yang diberikan pada tikus nefrolithiasis yang di induksi EG dengan dosis	-	-	-
4	Kamil® <i>three in one</i> adalah obat herbal yang mengandung jinten hitam, propolis dan minyak zaitun yang diberikan pada tikus nefrolithiasis yang di induksi EG dengan dosis 1 kapsul/hari per oral.	-	-	-
5	Etilenglikol adalah penginduksi terbentuknya CaOX dengan dosis 0,75% v/v per oral.	-	-	-
Variable terikat	Definisi	Alat / Metode	Hasil Ukur	Skala
1	Kadar kreatinin adalah kadar kreatinin yang diperoleh dari darah tikus nephrolithiasis.	Menggunakan metode jaffe reaction pada spektrofotometer UV-vis.	Mg/dL	Ratio
2	Kadar BUN adalah kadar ureum yang diperoleh dari darah tikus nephrolithiasis.	Menggunakan metode enzimatik dan alat spektrofotometer	Mg/dL	Ratio

E. Pengumpulan Data

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, timbangan hewan, kandang hewan uji, sentrifuge, mortar stamper, rotary evaporator, spuit 1 ml, 3 ml, dan 10 ml, jarum suntik sonde, evendorf, reagen, kuvet, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu® serial No. A125360, labu ukur 100 ml dan 10 ml, beaker glass 500 ml, gelas ukur 100 ml, pengaduk kaca, pipet tetes, pipet volume 1, 2, 5, 10, 50 ml, pipet ukur 5 ml, seperangkat alat bedah, Erlenmeyer 250 ml, buret 25 ml, statif, gelas arloji, klemp, ball pipet.

2. Bahan Penelitian

Tikus jantan wistar sebanyak 25 ekor dari peternakan Salatiga, pakan standar BR2, thiamin, captopril, vitamin E, dan herbal Kamil® *three in one*, etilenglikol, CMC Na 6 gr, aquades, reagen kit ureum, reagen pencuci cuvet khusus, reagen kit kreatinin.

3. Prosedur Kerja

a. Pembuatan larutan koloidal Na. CMC 1% b/v

- 1) Na-CMC ditimbang sejumlah 500 mg
- 2) Dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam 50 ml aquadest panas, sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga membentuk larutan koloidal
- 3) Volumanya ditambahkan dengan aquadest hingga 100 ml. (Viani & Hijratul, 2016).

b. Pembuatan suspensi captopril

- 1) Ditimbang captopril 10 tablet 25 mg, dihitung beratnya.
- 2) Digerus dengan mortar stamper lalu ditimbang setara dengan hasil perhitungan dosis captopril.
- 3) Ditambahkan larutan koloidal Na CMC 1% sedikit demi sedikit sambil digerus hingga homogen
- 4) Dimasukan dalam labu takar, ad volumenya dengan larutan Na CMC 1% hingga 100 ml (Viani & Hijratul, 2016).

c. Penyiapan dan pengumpulan thiamin, vitamin E, dan herbal Kamil® *three in one* dari wadahnya dengan spuit.

- 1) Thiamin berbentuk cair diambil langsung dari botolnya dengan spuit 1 ml lalu dioralkan kepada tikus uji.
- 2) Vitamin E dan herbal Kamil® *three in one* merupakan kapsul lunak sehingga di potong kapsulnya terlebih dahulu, isinya dituang dalam pot kecil hingga volume cukup untuk masing-masing kelompok vitamin E dan herbal Kamil® *three in one*, lalu dioralkan kepada tikus uji.

4. Perhitungan dosis kelompok perlakuan.

5. Perlakuan hewan uji

Hewan diaklimasi selama kurang lebih 1 minggu, dipantau berat badan, dibagi secara acak sesuai kelompok perlakuan, dilakukan induksi dengan etilen glikol selama 28 hari dan diberi perlakuan menggunakan thiamin, captopril, vitamin E, dan herbal 3 in 1 sesuai dengan tiap dosis obat selama

14 hari dari hari ke 15 -28. Pada hari ke 29 diukur berat badan, kadar kreatinin dan kadar BUN.

6. Pembedahan Hewan Uji

- a. Sampel darah diambil dari jantung tikus wistar.
- b. Hewan uji tikus dianastesi secara intraperitoneal menggunakan ketamin 2 mg/kgBB.
- c. Letakkan tikus di nampan bedah, mulai bedah dari perut hingga rongga dada sampai jantung terlihat.
- d. Ambil darah dari jantung dan sekitarnya menggunakan spuit.
- e. Masukkan darah dalam tabung EDTA sampai 2 ml.

7. Analisis Sampel

- a. Sampel darah hewan uji di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit pada suhu 30°C.
- b. Lalu terbentuk 2 lapisan, ambil supernatan dan tambahkan reagen 1 sebanyak 1 ml, kocok hingga homogen, inkubasi selama 5 menit.
- c. Setelah 5 menit ditambahkan reagen 2, kocok hingga homogen dan inkubasi kembali selama 10 menit
- d. Siapkan spektrofotometri UV-vis, blanko dan sampel untuk pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin.
- e. Siapkan dan tuang blanko ke kuvet, atur panjang gelombang 578 nm untuk ureum dan 492 nm untuk kreatinin.
- f. Kembalikan blanko ke tabungnya, cuci kuvet menggunakan aquades.

- g. Mulai siapkan larutan standar kreatinin / ureum pada kuvet depan dan larutan sampel kreatinin / ureum pada kuvet belakang.
- h. Tunggu analisis spektrofotometri untuk mendapatkan hasil.
- i. Untuk analisis kreatinin, diamkan 2 menit setelah hasil absorbansi pertama didapatkan untuk mendapatkan absorbansi kedua
- j. Hitung kadar kreatinin dan ureum menggunakan.

F. Pengolahan Data

1. Penetapan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan tikus dilakukan dengan menggunakan timbangan elektrik dan wadah plastik. Cara penimbangan dilakukan dengan meletakkan timbangan ditempat yang datar, kemudian timbangan dikalibrasi dengan cara meletakkan wadah plastik diatas timbangan. Setelah itu tikus dimasukkan kedalam wadah plastik lalu timbang dan lakukan pencatatan. Tujuan penimbangan ini adalah untuk mengetahui peningkatan atau penurunan berat badan tikus saat dilakukan penelitian..

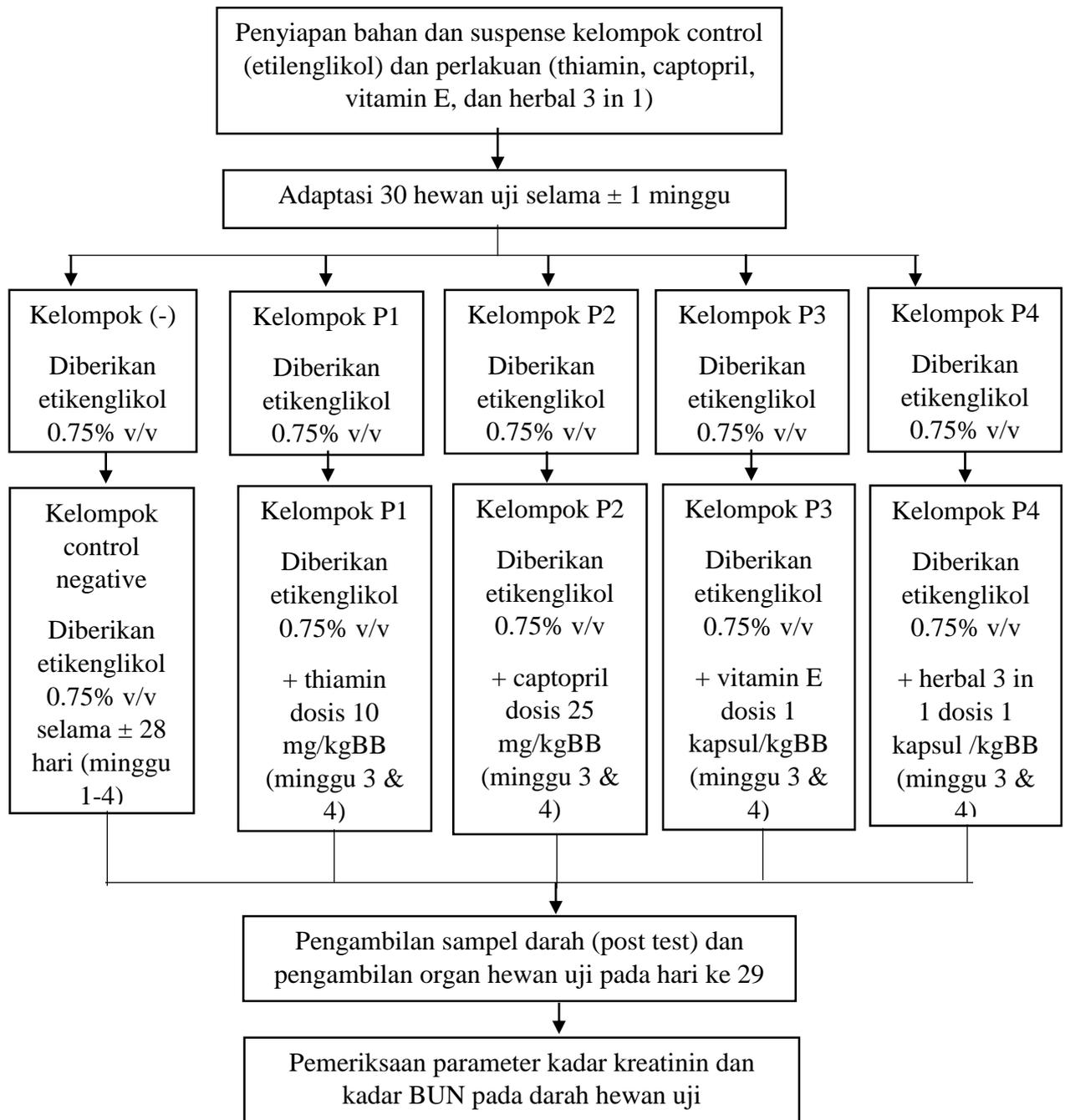
2. Penetapan Kadar Kreatinin

Pemeriksaan kadar kreatinin terdiri dari pembuatan reagensia, pengukuran nilai absorpsi kreatinin serum darah sampel dengan spektrofotometer. Kegiatan ini dilakukan pada minggu ke-4.

3. Penetapan kadar Ureum

Pengamatan dan pengukuran kadar BUN dilakukan dengan menyiapkan sampel serum tikus, reagen A1, reagen A2, dan larutan standar ureum.

4. Alur Penelitian



G. Analisis Data

Data penelitian ini berupa pengukuran berat badan tikus, kadar kreatinin dan ureum yang dianalisa dengan pola ragam Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan uji *Analysis of Varians* (ANOVA) atau uji *Kruskal-Wallis* dengan aplikasi IBM SPSS Windows seri 25. Uji ANOVA $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* di aplikasi IBM SPSS.

