

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu model desain eksperimental *posttest only with control group design* dengan rancangan acak lengkap (RAL).

B. Waktu dan tempat Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Kimia Prodi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo. Waktu penelitian dilakukan di bulan Desember 2023 sampai Januari 2024.

C. Identifikasi variabel

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang ditetapkan pada penelitian ini yaitu thiamin 100mg/mL, kaptopril 25mg/mL, vitamin E, dan obat herbal Kamil 3in1.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu pembentukan kalsium oksalat (CaOx) pada ginjal dan pengukuran kadar MDA darah pada hewan uji tikus.

D. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil	Skala
Thiamin	merupakan vitamin larut dalam air yang digunakan sebagai perlakuan pada hewan uji sesuai dosis pemberian.	-	-	-
Kaptopril	merupakan obat antihipertensi golongan ACE Inhibitor digunakan sebagai perlakuan pada hewan uji sesuai dosis pemberian.	-	-	-
Vit. E	merupakan suatu vitamin yang larut dalam lemak yang digunakan sebagai perlakuan pada hewan uji sesuai dosis pemberian.	-	-	-
Kamil 3in1	merupakan obat herbal yang memiliki tiga kandungan utama yaitu jinten hitam (<i>habbatussauda</i>), zaitun dan ekstrak propolis yang digunakan sebagai perlakuan pada hewan uji sesuai dosis pemberian.	-	-	-
Kadar Kalsium Oksalat	adalah kadar kalsium oksalat (CaOx) dalam ginjal pada tikus induksi nefrolithiasis.	Titrasi Permanganometri	Kadar Oksalat Ginjal	% Kadar Oksalat
MDA (<i>Malondialdehyde</i>)	adalah hasil akhir dari peroksidasi lipid sebagai biomarker penanda derajat stres oksidatif pada tikus induksi nefrolithiasis.	Spektrofotometer UV-Vis	Kadar MDA	µg/dL

E. Identifikasi Sampel

1. Sampel

Perhitungan sampel pada tikus dilakukan menggunakan rumus Ferreder:

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

Keterangan:
 n = jumlah kelompok
 t = kelompok sampel

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok uji (t=6)

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4+1 = 5 \text{ tikus}$$

Jadi, jumlah hewan uji yang digunakan dalam setiap kelompok yaitu sebanyak 5 ekor tikus.

2. Kelompok perlakuan

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Jenis perlakuan terhadap hewan uji (hari ke-)	
	1 → 14	15 → 28
EG	EG 0,75%	EG 0,75%
Thiamin	EG 0,75%	EG 0,75% + Thiamin 10 mg/kgBB
Kaptopril	EG 0,75%	EG 0,75% + captopril 25 mg/kgBB
Vitamin E	EG 0,75%	EG 0,75% + vit. E 1 caps/kgBB
Herbal	EG 0,75%	EG 0,75% + Kamil 3in1 1 caps/kgBB
Kamil 3in1		

Keterangan :

EG : Etilen Glikol

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

- 1) Tikus putih jantan galur wistar
- 2) Berumur 2 – 3 bulan

- 3) Sehat
 - 4) Berat badan berkisar antara 180-200 gram
- b. Kriteria Eksklusi
- 1) Tikus mati selama perlakuan
 - 2) Tikus sakit atau tidak bergerak aktif

F. Prosedur penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain timbangan analitik, spuit 1cc dan 3cc, sonde oral tikus, seperangkat alat bedah, *blood tube* EDTA, neraca analitik, timbangan hewan digital, gelas ukur, *beaker glass*, labu ukur, batang pengaduk, *erlemeyer*, *hot plate*, mortir dan stamper, *sentrifuge*, oven, buret, kuvet dan spektrofotometer UV-vis @Shimadzu UV-1900I.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etilen glikol 0,75%, pakan tikus (BR-2), CMC 1,0%, aquadest, thiamin, kaptopril 25mg, vitamin E dan herbal Kamil 3in1, asam oksalat, NaCl 8%, H₂SO₄ 2N, KMnO₄ 0,01 N, asam asetat glasial 50%, aluminium foil, kertas saring, *thiobarbituric acid* (TBA) 1%, *trichloroacetat* (TCA) 20%, dan 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) 6M.

3. Perhitungan Dosis Pemberian

a. Thiamin 100 mg/mL

Faktor konversi dosis manusia (70kg) ke dosis tikus (200g) : 0,018

$$\begin{aligned}
 \text{Berat badan tikus diasumsikan} &= 200 \text{ gram} \\
 \text{Dosis pemberian tikus 200 gram} &= 100 \text{ mg} \times 0,018 \\
 &= 1,8 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus} \\
 \text{Stok tersedia} &= 100 \text{ mg/mL} \\
 \text{Volume pemberian tikus 200 gram} &= \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}} \\
 &= \frac{1,8 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \\
 &= 1,8 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

b. Kaptopril 25 mg

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor konversi dosis manusia (70kg) ke dosis tikus (200g)} &: 0,018 \\
 \text{Berat badan tikus diasumsikan} &= 200 \text{ gram} \\
 \text{Dosis pemberian tikus 200 gram} &= 25 \text{ mg} \times 0,018 \\
 &= 0,45 \text{ mg}/200 \text{ gram BB tikus} \\
 \text{Volume pemberian tikus 200 gram} &= \frac{\text{dosis}}{\text{volume pemberian}} \\
 &= \frac{0,45 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \\
 &= 0,45 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok 100 mL :

$$\begin{aligned}
 \text{Larutan stok} &= 0,45 \text{ mg/mL} \times 100 \text{ mL} \\
 &= 45 \text{ mg}/100 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

c. Vitamin E 100 IU (@natur-e) kapsul dosis 2-3 kapsul/hari

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor konversi dosis Manusia (70kg) ke dosis tikus (200g)} &: 0,018 \\
 \text{Berat badan tikus diasumsikan} &= 200 \text{ gram} \\
 \text{Dosis pemberian tikus 200 gram} &= \text{Setengah dosis manusia}
 \end{aligned}$$

$$= \frac{2-3 \text{ kapsul}}{2}$$

$$= 1 - 1,5 \text{ kapsul/200gBBtikus}$$

d. Herbal Kamil 3in1 dosis : 2 - 3 kapsul/hari

BB tikus diasumsikan perhari : 200 gram

Dosis pemberian tikus 200 gram = setengah dosis manusia

$$= \frac{2-3 \text{ kapsul}}{2}$$

$$= 1 - 1,5 \text{ kapsul/200gBBtikus}$$

4. Perlakuan Hewan Uji

a. 25 Hewan uji tikus dibagi kedalam 5 kelompok kemudian diadaptasi selama ± 1 minggu, setelah itu dilakukan penimbangan berat badan sebelum diberikan intervensi atau perlakuan.

b. Hewan uji diberi perlakuan induksi pada semua kelompok pada hari ke-1 sampai 28.

c. Pada hari ke-29 berat badan hewan uji ditimbang kembali setelah diberikan perlakuan, kemudian hewan uji dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel darah dan organ ginjal.

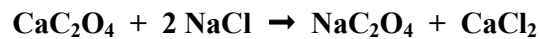
d. Pengambilan Sampel Darah dan Organ

Hewan uji tikus dikorbankan terlebih dahulu dengan pemberian anestesi overdosis ketamine HCl dosis 0,2mg/mL/kgBB tikus. Alat bedah dan scalpel disiapkan untuk membantu pengambilan sampel dan organ. Setelah mati, hewan uji tikus

dibedah kemudian diambil sampel darah melalui jantung dan organ ginjalnya.

5. Penetapan kadar Oksalat dalam Ginjal

Sampel organ ginjal diambil kemudian dicacah, setelah itu dilakukan perebusan menggunakan 20 mL larutan NaCl 8% pada suhu 80°C. Hal ini dilakukan untuk mereduksi kandungan oksalat dari ginjal sehingga oksalat larut pada larutan NaCl dengan reaksi sebagai berikut:



Selanjutnya larutan hasil rebusan dibiarkan dingin, lalu disaring kemudian ditambahkan 10,0 mL aquadest dan 1,0 mL H₂SO₄ sebagai katalisator. Selanjutnya campuran tersebut dititrasi menggunakan larutan KMnO₄ 0,01N hingga titik akhir titrasi yaitu ditandai oleh perubahan warna menjadi merah muda. Baku pembanding yang digunakan yaitu larutan asam oksalat.

6. Penetapan kadar MDA

Metode Penetapan kadar MDA yang digunakan yaitu metode *Thiobarbituric Acid* (TBA). Menurut Yagi (1994), metode TBA memiliki nilai kepekaan tinggi terhadap radikal bebas yang dalam berbagai tahap oksidasi dapat dengan mudah diaplikasikan pada sampel uji. TBA akan bereaksi dengan gugus karboksilat dari MDA membentuk kompleks MDA-TBA dalam suasana asam kemudian akan menghasilkan produk berwarna sehingga dapat dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*.

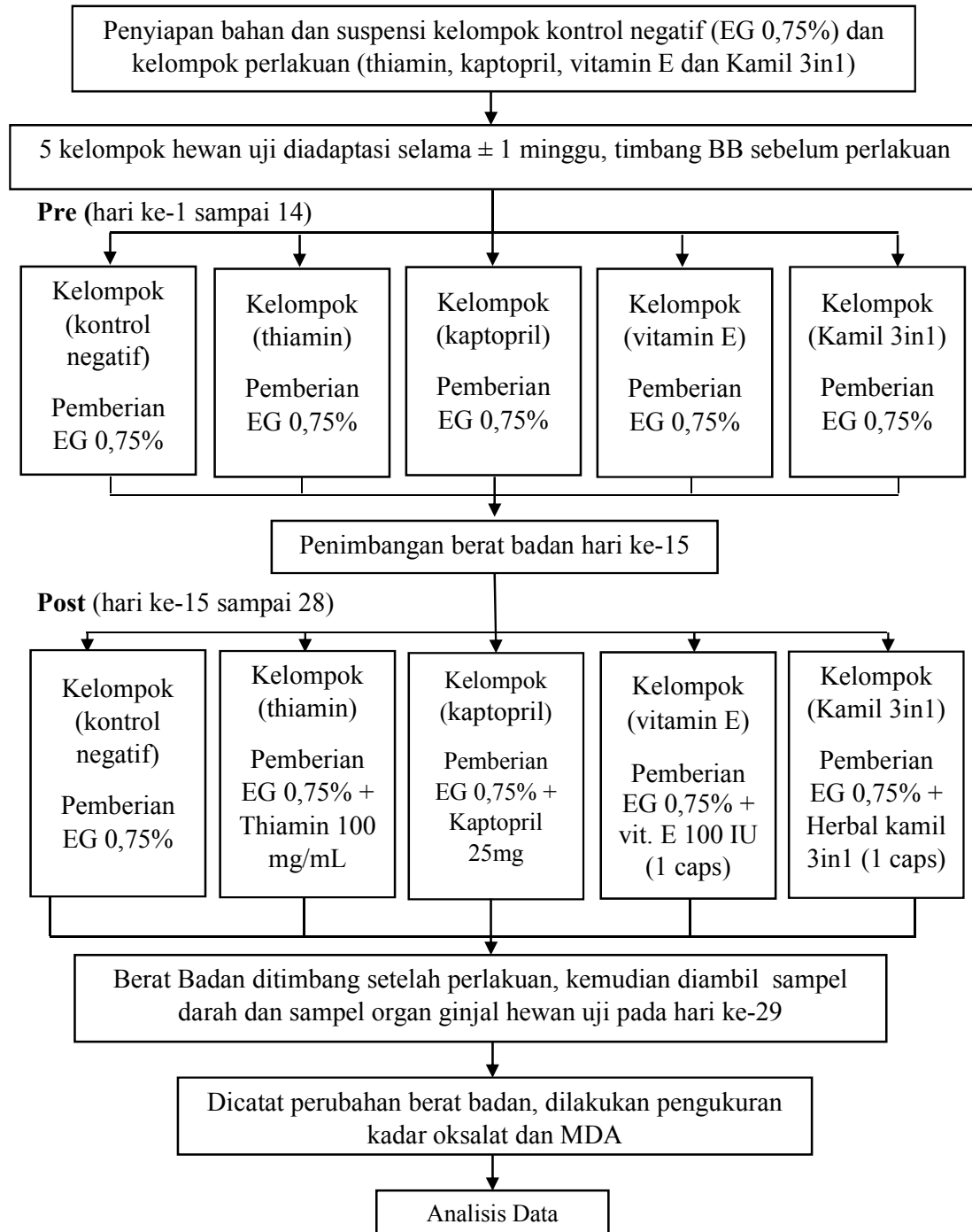
a. Pembuatan Kurva Baku

Larutan stok pereaksi 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) konsentrasi 6M diencerkan menjadi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ppm dengan aquadest masing-masing hingga 10mL. Kemudian setiap konsentrasi TEP direaksikan ke dalam 1,0 mL TCA 20% dan 1,0 mL TBA 1% dalam pelarut asam asetat glasial 50%. Semua larutan selanjutnya diinkubasi selama ± 45 menit suhu 95°C . Setelah dingin, larutan disentrifugasi selama 15 menit kecepatan 1000 rpm. Supernatan lapisan atas diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ_{max} 531,5 nm.

b. Pengukuran Sampel

Pengukuran konsentrasi dari sampel percobaan dilakukan dengan cara yang sama seperti larutan standar, yaitu 1,0 mL sampel plasma darah diambil melalui organ jantung direaksikan dengan 1,0 mL TCA 20% dan 1,0 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%, selanjutnya diinkubasi selama 45 menit suhu 95°C , kemudian dibiarkan dingin. Larutan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 1000 rpm. Supernatan dipisahkan, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada λ_{max} 531,5 nm. Konsentrasi sampel diperoleh dengan memplot data absorbansi sampel ke dalam kurva standar.

G. Alur penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

H. Analisis data

Data hasil pengukuran penetapan kadar kalsium oksalat dan MDA selanjutnya dilakukan uji normalitas data menggunakan *Shapiro-wilk test* untuk mengetahui data berdistribusi normal atau tidak normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas data menggunakan *levene test* untuk mengetahui data homogen atau tidak homogen. Hasil uji normalitas dan homogenitas ini menentukan analisis berikutnya, yaitu analisis parametrik bila data berdistribusi normal dan homogen, serta analisis non parametrik jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen.