BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data pada penelitian ini dilakukan hanya pada saat akhir penelitian yaitu setelah dilakukannya perlakuan. Data dibandingkan antara hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan (Ratya, 2014).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selama 4 bulan, yaitu terhitung dari bulan September hingga Desember 2015.

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus* berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gr. Hewan ini memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia, dapat ditemukan dan

ditangani dengan mudah. Sampel penelitian ini adalah jaringan ginjal tikus populasi yang telah diberikan amoksisilin dosis toksik.

3.3.2 Kriteria Inklusi

a. Tikus putih jantan *Rattus norvegicus*
b. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam, rontok, atau botak)
c. Memiliki berat badan 100-200 gr
d. Berusia sekitar 6-7 minggu

3.3.3 Kriteria Eksklusi

a. Tikus mati sebelum mendapat perlakuan

3.3.4 Kriteria *Drop Out*

a. Tikus mati saat diberikan perlakuan
b. Tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif, tidak mau makan, penampakan rambut kusam, rontok, atau botak) saat diberikan perlakuan

3.3.5 Besar Sampel

Pada uji eksperimental rancangan acak lengkap, besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus Frederer:

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

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

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

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

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,7$$

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 3 ekor tikus untuk tiap kelompok. Kemudian untuk *Drop Out* ditambahkan 10% pada masing-masing kelompok. Sehingga sampel yang dibutuhkan perkelompoknya yaitu sebanyak 4 ekor tikus.

Dalam penelitian ini digunakan 36 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus)* jantan yang terbagi dalam 9 kelompok, yaitu:

a. Kelompok kontrol negatif (KN): tikus diberikan aquades sebanyak 1 ml dengan frekuensi 3 kali per hari selama 14 hari.
b. Kelompok kontrol positif A (KA): tikus diberikan amoksisilin generik selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 10,71 mg/kgBB tikus.
c. Kelompok kontrol positif B (KB): tikus diberikan amoksisilin generik bermerek selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 10,71 mg/kgBB tikus.

d. Kelompok A1: tikus diberikan amoksisilin generik selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kgBB tikus.

e. Kelompok A2: tikus diberikan amoksisilin generik selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kgBB tikus.

f. Kelompok A3: tikus diberikan amoksisilin generik selama 14 hari. dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kgBB tikus.

g. Kelompok B1: tikus diberikan amoksisilin generik bermerek selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kgBB tikus.

h. Kelompok B2: tikus diberikan amoksisilin generik bermerek selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kgBB tikus.

i. Kelompok B3: tikus diberikan amoksisilin generik bermerek selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kgBB tikus.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan berupa kandang, tempat minum dan makan, neraca analitik, mikropipet (volume 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl),

Tip mikropipet (10 µl, 100 µl, 1000 µl), *microtube* 1,5 ml dan 2 ml, alat sentrifugasi Hettich, *Micropestle*, *Freezer* -80°C, Spektometer UV (Shimadzu), kuvet kaca, alat-alat laboratorium (gelas kimia, pipet, pinset, sendok, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, botol penyimpanan larutan, dll), sonde lambung, rak tabung, aluminium foil, alat-alat bedah minor, sarung tangan karet, dan alat tulis menulis (Anatriera, 2009).

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian lanjutan ini adalah sampel jaringan ginjal tikus putih galur *Sprague dawley* sesuai dengan kriteria yang ditetapkan, H_2O_2 30% *Merck*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Na_2HPO_4 *Merck*, KH_2PO_4 *Merck*, NaCl *Merck*, *Aquadest, Aquabidest*, *Bovine Serum Albumine* (BSA) *Merck*, dan lain-lain (Anatriera, 2009).

3.5 Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

3.5.1 Variabel Penelitian

a. Variabel terikat: aktivitas spesifik katalase ginjal tikus.
b. Variabel bebas: dosis toksik amoksisilin generik berlogo dan bermerek.

3.5.2 Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Hasil Ukur	Skala
Dosis toksik amoksisilin generik	Jumlah amoksisilin generik yang diharapkan menimbulkan suatu efek toksik stres okidatif pada jaringan ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Dosis yang digunakan adalah sebagai berikut: a. Kelompok A1: 102,8 mg/kgBB 3 kali sehari b. Kelompok A2: 205,6 mg/kgBB 3 kali sehari c. Kelompok A3: 411,2 mg/kgBB 3 kali sehari d. Kelompok KA: 10.71 mg/kgBB 3 kali sehari	mg/kgBB	Numerik
Dosis toksik amoksisilin generik bermerek	Jumlah amoksisilin generik bermerek yang diharapkan menimbulkan suatu efek toksik stres okidatif pada jaringan ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*. Dosis yang digunakan adalah sebagai berikut: a. Kelompok B1: 102,8 mg/kgBB 3 kali sehari b. Kelompok B2: 205,6 mg/kgBB 3 kali sehari c. Kelompok B3: 411,2 mg/kgBB 3 kali sehari d. Kelompok KB: 10,71 mg/kgBB 3 kali sehari	mg/kgBB	Numerik
Aktifitas spesifik katalase	Aktivitas spesifik katalase ginjal merupakan aktivitas katalase yang diukur menggunakan spektrofotometer pada pH 7 kemudian hasilnya dibagi dengan kadar protein dalam sampel (Anatriera, 2009). Semakin toksik obat yang diberikan maka semakin meningkat aktivitasnya.	Unit/mg	Numerik

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan uji pendahuluan yang bertujuan untuk melihat apakah dosis maksimum memberikan kerusakan yang bermakna. Apabila dosis maksimum manusia pada tiga variasi menunjukan kerusakan yang bermakna, maka penelitian dilanjutkan dengan populasi tikus yang sama dengan pengulangan sesuai rumus Frederer. Apabila pada uji pendahuluan tersebut tidak terdapat kerusakan yang bermakna, maka dua kali dosis maksimum akan dibuat menjadi tiga variasi kembali menggunakan prinsip setengah, satu, dan dua kali dengan pengulangan sesuai rumus Frederer dengan mengikuti prosedur dibawah ini:

3.6.1 Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram selama satu minggu untuk adaptasi di tempat pemeliharaan dalam menyeragamkan cara hidup dan makanannya sebelum dilakukan percobaan. Tikus ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari kawat ram dan dialasi sekam, makanan tikus berupa pelet. Pemberian makanan dan minuman diberikan *ad libitum*. Lingkungan kandang dibuat agar tidak lembab, dengan suhu kandang dijaga sekitar 25^0C. 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 Persiapan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 jenis obat amoksisilin yang didapat di apotek di Bandar Lampung. Amoksisilin generik dan amoksisilin generik bermerek yang digunakan diproduksi oleh PT Kimia Farma. Dosis amoksisilin yang digunakan merupakan dosis maksimum untuk manusia yaitu 1000 mg amoksisilin yang diberikan 3 kali perhari. Dosis amoksisilin tersebut dikonversi menjadi dosis toksik tikus menggunakan rumus BSA (*Body Suraface Area)* yang terangkum pada rumus dibawah ini.

HED (mg/kg) = dosis hewan coba x km hewan coba / km manusia

HED (*Human Equivalent Dose*) merupakan dosis yang digunakan pada manusia. Satuan yang digunakan dalam HED berupa mg/kg BB. Km adalah faktor koreksi yang mencerminkan hubungan antara berat badan dan tubuh dengn luas permukaan (Leonid, 2012). Dosis toksik amoksisilin yang digunakan sebesar 1000 mg dan dikonversi dalam bentuk mg/kgBB. Berat badan yang digunakan sebagai pembagi merupakan berat badan rata-rata manusia yang digunakan dalam konversi HED, yaitu 60 Kg. Sehingga jumlah HED amoksisilin sebesar:

HED (mg/kg) = dosis obat / berat badan

HED (mg/kg) = 1000 mg / 60 kg

HED (mg/kg) = 100/6 mg/kg

HED (mg/kg) = 16,67 mg/kg

HED yang didapat akan dikonversikan ke dosis hewan coba menggunakan rumus BSA. Km yang digunakan untuk manusia dewasa normal sebesar 37 dan Km hewan coba (tikus) sebesar 6 (Leonid, 2012). Sehingga didapat dosis hewan coba sebesar:

HED (mg/kg) = dosis hewan coba x km hewan coba/km manusia

16,67 (mg/kg) = dosis hewan coba x 6/37

Dosis hewan coba = 37/6 x 16,67 mg/kg

Dosis hewan coba = 102,79 mg/kg

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 102,79 mg/kgBB dibulatkan menjadi 102,8 mg/kgBB. Dosis maksimum tikus tersebut dibuat menjadi 3 variasi dosis menggunakan prinsip satu, dua, dan empat kali dosis maksimum. Berdasarkan hal tersebut, didapatkan dosis sebesar 102,8 mg/kgBB tikus; 205,6 mg/kgBB tikus dan 411,2 mg/kgBB tikus. Untuk kelompok kontrol positif, digunakan dosis pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 10,71 mg/kgBB.

3.6.3 Induksi Nefrotoksik dengan Amoksisilin

Setelah 1 minggu aklimatisasi hewan coba atau tikus putih, tikus diberikan amoksisilin sesuai dengan variasi dosis baik amoksisilin generik maupun generik bermerek dengan dosis 102,8 mg/kgBB tikus; 205,6 mg/kgBB tikus dan 411,2 mg/kgBB tikus dengan frekuensi 3 kali

perhari selama 14 hari pada kelompok perlakuan. Untuk kelompok kontrol negatif, diberikan *aquadest* selama 14 hari, sedangkan untuk kelompok kontrol positif A dan B diberikan amoksisilin generik dan generik bermerk masing-masing 10,71 mg/kgBB tikus. Masing-masing kelompok diberikan amoksisilin secara peroral menggunakan sonde lambung. Pemberian secara peroral bertujuan agar amoksisilin yang diberikan melalui fase absorbsi, distribusi, metabolisme dan eliminasi secara normal.

3.6.4 Terminasi Hewan Coba

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir dengan menggunakan prinsip yang akan dijelaskan pada etika penelitian. Tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75-100 mg/kg:5-10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara IP, kemudian dieuthanasia dengan metode *cervical dislocation* dan dilakukan laparotomi untuk mengambil organ ginjal (Ratya, 2014).

3.6.5 Pembuatan Homogenat Jaringan Ginjal

Sampel jaringan ginjal yang telah diambil kemudian dibuat homogenat dengan menambahkan PBS pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS sama dengan 1:1. Kemudian secara bertahap, masukan PBS ke dalam jaringan ginjal dan dihaluskan dengan menggunakan *micropestle*. Kemudian homogenat disentrifugasi dengan kecepatan

5.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit lalu pisahkan supernatan dari pelet. Sampel disimpan dalam *deep freezer* (-86°C) (Anatriera, 2009).

3.6.6 Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh blanko dan sampel setiap 30 detik menit selama 2 menit. Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan cara mempipetkan ke dalam kuvet 950 µl larutan H_2O_2 dengan pengenceran optimal adalah 1:4000 ditambahkan dengan 50 µl PBS 0.05 M dengan pH 7. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan pengocokkan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm. Pada pengukuran absorbansi sampel, sebanyak 50 µL sampel ditambahkan pada 950 µL H_2O_2 dengan pengenceran 1:4000, kemudian dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko. Selanjutnya penguraian H_2O_2 oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangkan absorbansi di awal (t1) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, tx). 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 (Anatriera, 2009).

3.6.7 Penentuan Kurva Standar Protein

Timbang 50 mg BSA dan larutkan dalam *aquabidest* dengan perbandingan 1:1. Larutan BSA kemudian diencerkan dengan perbandingan 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,8. Kemudian serapannya diukur pada panjang gelombang 280 nm. Hasil aktivitas spesifik pengukuran dicatat dalam tabel dan dibuat kurvanya. Dari kurva tersebut didapatkan rumus untuk menghitung konsentrasi protein jaringan (Anatriera, 2009).

3.6.8 Penentuan Konsentrasi Protein Ginjal

Ukur absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada pengenceran optimal, pada panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran kemudian dicatat dalam tabel. Kemudian konsentrasi protein (mg/mL) ginjal tersebut dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel (Anatriera, 2009).

3.6.9 Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

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 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan

hilangnya aktivitas katalase. Perhitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut:

Aktivitas katalase (Unit/ml) =

$$\frac{(\Delta \text{ absorbansi uji} - \Delta \text{ absorbansi blanko})/\text{menit}}{(\text{molaritas } H_2O_2) \times (\text{volume sampel yang diukur})} \times \text{faktor pengenceran}$$

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

$$\text{aktivitas spesifik katalase (U/mg)} = \frac{\text{aktivitas katalase (U/ml)}}{\text{kadar protein dalam sampel (mg/mL)}}$$

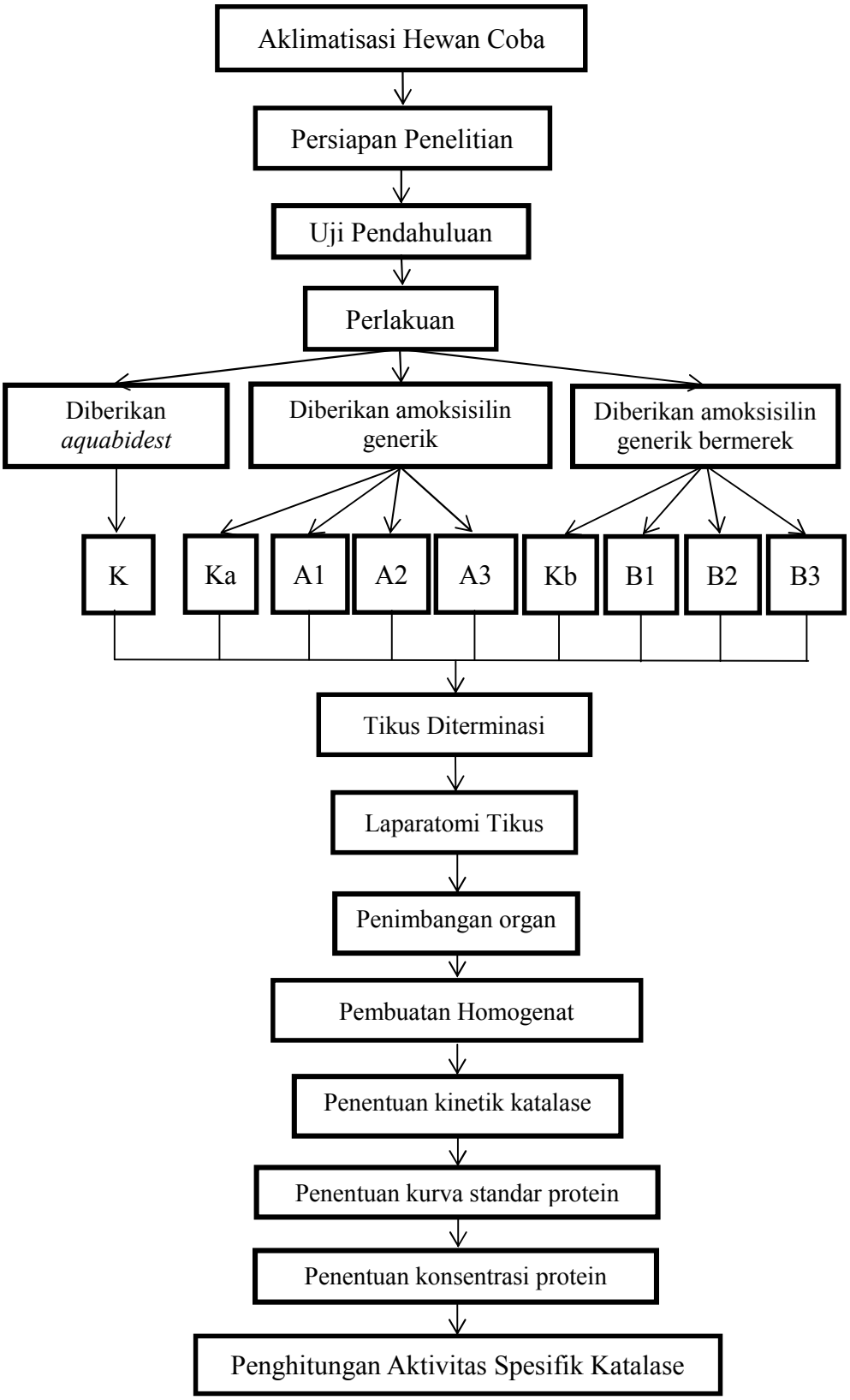
3.6.10 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan program komputer yaitu uji normalitas dan uji homogenitas data serta analisis bivariat untuk menilai tingkat perbedaan antara variabel bebas dan terikat.

a. Uji normalitas dilakukan untuk menilai apakah data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Analisis ini menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50.
b. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang digunakan homogen atau tidak. Analisis ini menggunakan uji Levene.
c. Analisis bivariat dilakukan dengan menggunakan uji parametrik *One Way* ANOVA. Jika pada uji *One Way* ANOVA memberikan hasil $p<0,05$ (hipotesis dianggap bermakna) maka dilakukan

analisis *post-hoc* LSD untuk menilai kebermaknaan antar kelompok.

3.7 Diagram Alir



Gambar 4. Diagram alir

3.8 Etika Penelitian

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 2440/UN26/8/DT/2015. Penelitian ini menerapkan prinsip 3R dalam protokol penelitian, yaitu sebagai berikut:

1. *Replacement*

   Adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.

2. *Reduction*

   Adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap dapat mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini, sampel dihitung berdasarkan rumus Frederer yaitu $t(n-1) \geq 15$, dimana t merupakan jumlah kelompok percobaan dan n merupakan jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

3. *Refinement*

   Adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi, yaitu sebagai berikut:

   a. Bebas dari rasa lapar dan haus, dalam penelitian ini hewan coba diberikan pakan dan minum standar secara *ad libitum*.

   b. Bebas dari ketidak-nyamanan, dalam penelitian ini hewan coba ditempatkan di dalam kandang plastik dengan tutup terbuat dari

kawat ram dan dialasi sekam dengan suhu dibuat agar tidak lembab yaitu sekitar 25^0C, dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Kemudian hewan coba terbagi menjadi 4 ekor tiap kandang dan diletakkan jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia serta kandang dijaga kebersihannya, sehingga dapat mengurangi stres pada hewan coba.

c. Bebas dari nyeri dan penyakit. Dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan coba jika diperlukan. Pada penelitian, hewan coba diberikan perlakuan dengan menggunakan sonde lambung dilakukan dengan mengurangi rasa nyeri sesedikit mungkin. Dosis perlakuan diberikan berdasarkan literatur yang telah ada.

Prosedur perlakuan dan pengambilan sampel selama penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi dan prinsip etika penelitian hewan coba. Hal ini dilakukan untuk menghargai kehidupan hewan coba sesuai dengan etika penelitian yang berlaku (Ridwan, 2013).