

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*. Pengambilan data dilakukan hanya pada saat akhir penelitian setelah dilakukannya perlakuan dengan membandingkan hasil pada kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan 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* jantan berusia 6-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram. Hewan ini memiliki sistem metabolisme yang mirip dengan manusia, dapat ditemukan dan ditangani dengan mudah, serta diharapkan pengambilan data dapat lebih akurat dibandingkan jika menggunakan

mencit sebagai hewan coba, karena tubuh mencit yang relative lebih kecil. Sampel adalah jaringan ginjal tikus populasi yang telah diberikan amoksisilin dosis toksik.

3.3.2. Kriteria Inklusi

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

3.3.3. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit dan mati sebelum mendapat perlakuan

3.3.4. Kriteria *Drop Out*

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

3.3.5. Besar Sampel

Setiap perlakuan menggunakan pengulangan dengan rumus Federer untuk desain penelitian eksperimen laboratorik rancangan acak lengkap yaitu:

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

keterangan:

(t) = jumlah kelompok perlakuan

(n) = jumlah pengulangan pada setiap kelompok perlakuan

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3.1$$

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 4 ekor tikus untuk tiap kelompok. Terdapat 7 kelompok perlakuan, maka dibutuhkan 28 sampel. Untuk mengantisipasi adanya *drop out* dibutuhkan 10% dari jumlah anggota tiap kelompok.

$$\text{Drop Out} = 10\% \times 4$$

$$= 0,4 \text{ per kelompok perlakuan}$$

Untuk sampel *drop out* maka dibutuhkan setidaknya 1 ekor tikus per kelompok perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan 35 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang terbagi dalam 7 kelompok, yaitu: .

- a. Kelompok kontrol (K): tikus tidak diberikan perlakuan.
- b. Kelompok A1: tikus diberikan amoksisilin generik berlogo A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB tikus.
- c. Kelompok A2: tikus diberikan amoksisilin generik berlogo B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB tikus.

- d. Kelompok A3: tikus diberikan amoksisilin generik berlogo C selama 14 hari. dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB tikus.
- e. Kelompok B1: tikus diberikan amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB tikus
- f. Kelompok B2: tikus diberikan amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB tikus
- g. Kelompok B3: tikus diberikan amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB tikus

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan berupa kandang, tempat minum dan makan, neraca analitik, sonde lambung, alat-alat bedah minor, *testube* 2 mL, *freezer* suhu -4°C dan -80°C , alat-alat laboratorium (gelas-gelas kimia, sendok, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, botol penyimpanan larutan, dan lain lain), spektrofotometer dan tabung kuvet, mikropipet dan tip, *vortex* dan *micropestle*

3.4.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah :

1. Organ renal tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang telah diberi perlakuan
2. Larutan *Phosphate Buffer Saline* 0,1 M pH 7,0, 7,4, dan 8,0
3. Pereaksi untuk pengukuran kadar glutation (GSH):
 - GSH standar
 - TCA (asam trikloroasetat) 5%
 - DTNB (ditio bisnitro benzoat)

3.5. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

3.5.1. Variabel Penelitian

- a. Variabel terikat: kadar glutation renal tikus
- b. Variabel bebas: jenis dan sediaan amoksisilin dosis toksik

3.5.2. Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional pada tabel berikut

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Dosis Toksik Amoksisilin Generik Berlogo	Jumlah amoksisilin berlogo yang diharapkan menimbulkan stres oksidatif pada jaringan ginjal <i>Rattus norvegicus</i> galur <i>Sprague Dawley</i> . Dosis yang digunakan pada penelitian yaitu: a. Kelompok A1: tikus diberi amoksisilin generik berlogo A selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB tikus. b. Kelompok A2: tikus diberi amoksisilin generik berlogo B selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB tikus. c. Kelompok A3: tikus diberi amoksisilin generik berlogo C selama 14 hari. dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB tikus.		Dosis obat dalam miligram (mg)	Numerik
Dosis Amoksisilin Generik Bermerk	Jumlah amoksisilin berlogo yang diharapkan menimbulkan stres oksidatif pada jaringan ginjal <i>Rattus norvegicus</i> galur <i>Sprague Dawley</i> . Dosis yang digunakan pada penelitian yaitu: a. Kelompok B1: tikus diberi amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 102,8 mg/kg BB tikus b. Kelompok B2: tikus diberi amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 205,6 mg/kg BB tikus c. Kelompok B3: tikus diberi amoksisilin generik bermerk selama 14 hari dengan frekuensi 3 kali per hari dengan dosis 411,2 mg/kg BB tikus		Dosis obat dalam miligram (mg)	Numerik
Kadar GSH renal	Kadar glutation dapat menggambarkan tingkat kerusakan sel renal akibat induksi zat yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Kadar GSH dinilai dengan mengamati adanya perubahan yang signifikan antarkelompok perlakuan. Semakin tinggi kadar GSH antar kelompok perlakuan, maka semakin rendah reaksi toksik amoksisilin yang ditimbulkan (Riani, 2004).	Diukur dengan metode Ellman	Kadar GSH ($\mu\text{mol/g}$)	Numerik

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Aklimatisasi dan Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba diaklimatisasi selama 1 minggu untuk adaptasi di tempat pemeliharaan berupa kandang yang tertutup kawat dan dialasi sekam. Makanan tikus berupa pelet. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Lingkungan kandang dijaga kelembaban, suhu, dan pencahayaannya. Kesehatan hewan coba dipantau setiap hari dan berat badan hewan coba diukur berkala sampai dengan tahap terminasi hewan coba.

3.6.2. Dosis Amoksisilin

Obat yang digunakan berupa amoksisilin generik berlogo dan generik bermerk. Dosis yang diberikan pada hewan coba berasal dari konversi BSA (*Body Surface Area*) dosis amoksisilin maksimum pada manusia (1000 mg) menjadi dosis hewan coba, perhitungan seperti di bawah ini (Reagan-Shaw *et al.*, 2008).

$$\text{HED} \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}} \right) = \text{dosis hewan coba} \times \frac{\text{Km hewan coba}}{\text{Km manusia}}$$

HED (*Human Equivalent Dose*) merupakan dosis pada manusia dengan satuan mg/kg BB. Dosis toksik amoksisilin dikonversi dalam bentuk mg/kg BB. Berat badan yang digunakan sebagai pembagi merupakan berat badan rata-rata manusia yang digunakan dalam konversi HED, yaitu 60 Kg. HED didapatkan dari dosis toksik dibagi dengan berat badan rata-rata sehingga jumlah HED amoksisilin sebesar 16,67 mg/kg.

Rumus konversi menggunakan suatu faktor konstanta (Km). Faktor Km merupakan hasil berat badan (kg) dibagi dengan BSA dalam satuan m^2 . Setiap makhluk hidup memiliki faktor Km yang berbeda. Nilai faktor Km manusia dewasa normal dan hewan coba (tikus) sebesar 37 dan 6. Sehingga didapat dosis hewan coba sebesar :

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

$$\text{Dosis hewan coba} = 16,67 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times \frac{37}{6}$$

$$\text{Dosis hewan coba} = 102,79 \text{ mg/kg/kali pemberian}$$

Dosis yang digunakan adalah 102,8 mg/kg untuk setiap kali pemberian dan dibuat menjadi 3 variasi dosis bertingkat dengan prinsip 1-2-4 sehingga didapatkan dosis sebesar: 102,8 mg/kg BB tikus dan 205,6 mg/kg BB tikus, 411,2 mg/kg BB tikus.

3.6.3. Induksi dengan Amoksisilin

Setelah 1 minggu aklimatisasi hewan coba. Pemberian amoksisilin dengan variasi dosis sesuai dengan kelompok perlakuannya dengan jenis obat amoksisilin generik berlogo maupun generik bermerk dengan dosis 51,4 mg/kg BB tikus, 102,8 mg/kg BB dan 205,6 mg/kg BB tikus per kali pemberian setiap hari selama 2 minggu pada kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok diberikan amoksisilin menggunakan sonde lambung.

3.6.4. Terminasi Hewan Coba dan Pengambilan Organ

Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *ketamine:xylazine* dosis 75-100mg/kg : 5-10 mg/kg (perbandingan 10:1) secara IP, kemudian di euthanasia dengan metode *cervical dislocation*.

Setelah itu tikus dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ ginjal. Dilanjutkan dengan memasukkan jaringan renal ke dalam tabung penyimpanan organ dan dimasukkan ke dalam *freezer* penyimpanan

3.6.5. Penyimpanan Organ

Berat ginjal masing-masing ditimbang dan dicatat kemudian ginjal dimasukkan dalam wadah steril pada suhu -4°C selama 1 hari. Setelah itu, suhu diturunkan hingga mencapai -80°C. Organ renal tikus disimpan di dalam *freezer* sampai dilakukan pembuatan homogenat. Sebelum dilakukan prosedur pembuatan homogenat, pertama-tama naikkan suhu *freezer* berisi organ renal yang akan diteliti dari suhu -80°C sampai dengan suhu -4°C selama 1 hari. Setelah itu, timbang kembali organ renal tersebut.

3.6.6. Pembuatan Homogenat Jaringan Renal

Jaringan renal diambil sebanyak 100 mg jaringan renal lalu ditambahkan dengan larutan PBS 0,1 M pH 7,4 sebanyak 0,5 mL,

haluskan dengan mesin *vortex* dan *micropestle*. Kemudian tambahkan 0,5 mL PBS 0,1 M pH 7,4 sampai volume mencapai 1 mL. Setelah itu disentrifugasi menggunakan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke *testube* kosong dan simpan pada suhu -20°C .

3.6.7. Pembuatan Larutan Standar Pengukuran Kadar GSH

Pembuatan larutan standar untuk pengukuran kadar glutathion jaringan renal menggunakan DTNB (*Ditio bisnitro benzoate*). Prinsip pengukuran yaitu reaksi antara DTNB dengan GSH yang akan menghasilkan senyawa tionitro benzoat yang berwarna kuning.

Sebanyak 4 mg standar glutathion dilarutkan dalam 25 mL PBS 0,1 M pH 8,0, kemudian dibuat dalam 2mg/mL. Dari larutan tersebut dibuat larutan glutathion dengan berbagai kandungan (1 μL , 2 μL , 4 μL , 5 μL dan 10 μL). serapan diukur menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm. Dari data pengukuran tersebut dibuat kurva standar dengan menghubungkan nilai serapan sebagai ordinat (sumbu y) dan konsentrasi larutan standar ($\mu\text{mol/mL}$) sebagai absis (sumbu x)

3.6.8. Pengukuran Kadar Glutathion Metode Ellman

Tambahkan 200 μL TCA 5% ke dalam masing-masing tabung, kocok sampai homogen. Tambahkan larutan PBS 0,1 M pH 8,0 ke dalam masing-masing tabung hingga volume mencapai 1.800 μL , campur hingga homogen. Kemudian ambil 800 μL larutan ke tabung lain

untuk dicampurkan dengan 25 μL DTNB, inkubasi selama 1 jam. Sisa larutan di dalam tabung (1200 μL) dijadikan sebagai blanko.

Ke dalam 50 μL sampel homogenat jaringan renal ditambahkan 200 μL TCA 5% dan 1.750 μL PBS pH 7,0, kocok sampai homogen. Larutan disentrifugasi (3500 rpm selama 10 menit). Ambil 800 μL supernatan dan tambahkan 25 μL DTNB, diinkubasi selama 1 jam. Sisa larutan supernatan digunakan sebagai blanko dan serapan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

Seluruh sampel diukur dengan prinsip triplo (tiga kali pengukuran) untuk menghindari kesalahan dalam penghitungan.

3.7. Pengolahan dan Analisis Data

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan software statistik dengan menggunakan analisis univariat dan analisis bivariat.

a. Analisis univariat

Analisis univariat dilakukan untuk menilai normalitas dan homogenitas data. Normalitas data diketahui dengan uji Shapiro-Wilk. Uji ini digunakan karena jumlah sampel kurang dari 50.

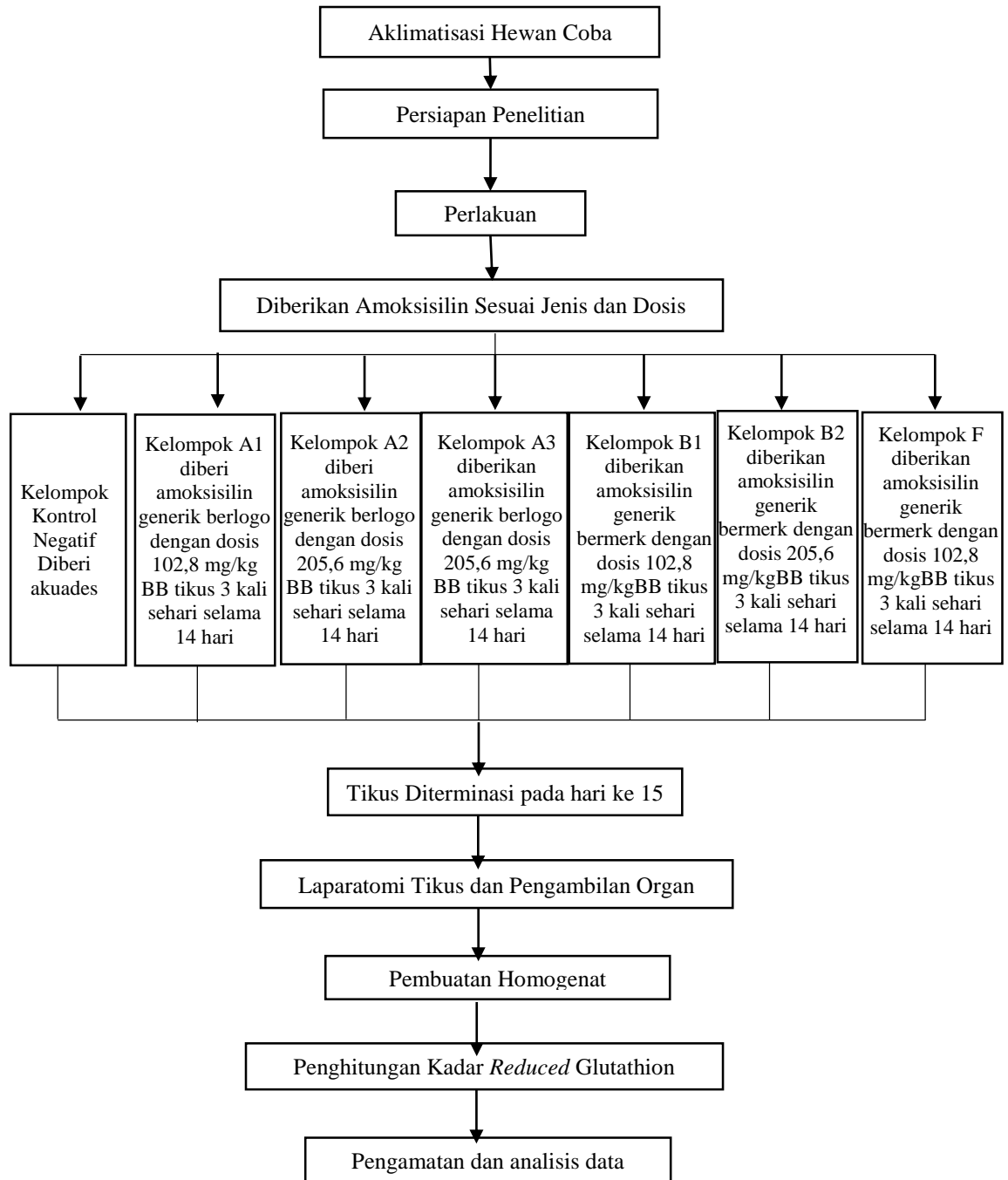
b. Analisis bivariat

Analisis bivariat dilakukan untuk menilai tingkat perbedaan antara variabel independen dan dependen. Apabila distribusi data normal dan homogen digunakan uji parametrik *One Way* ANOVA. Digunakan analisis non parametrik Kruskal-Wallis apabila distribusi data tidak normal dan tidak homogen.

- c. Batas derajat kemaknaan pada uji *One Way ANOVA* $p \leq 0,05$ (hipotesis dianggap bermakna). Bila hasil $p \leq 0,05$ maka akan dilakukan dengan analisis *post-hoc* LSD untuk menilai kebermaknaan antar kelompok. Apabila pada uji Kruskal-Wallis menunjukkan kebermaknaan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

3.8. Diagram Alir Penelitian

Pada penelitian ini akan menggunakan tikus putih sebanyak 35 ekor yang dibagi dalam 7 kelompok sebagai sampel untuk diambil jaringan ginjalnya. Tikus putih diaklimatisasi selama 1 minggu lalu diberi perlakuan selama 2 minggu setelah itu diterminasi dan diambil jaringan ginjalnya. Setelah itu diukur kadar glutathion renalnya, berikut diagram alir penelitiannya



Gambar 6. Diagram Alir Penelitian

3.9. Etika Penelitian

Ethical clearance untuk penelitian ini sudah didapatkan dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan mengajukan *ethical approval* ke Komisi Etika Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang menerapkan prinsip 3R dan 5F dengan nomor surat 2575/UN26/8/DT/2015. Prinsip 3R dalam protokol penelitian yaitu: *replacement, reduction dan refinement*. *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan coba telah diperhitungkan dan tidak dapat diganti oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Reduction* adalah memanfaatkan hewan coba sesedikit mungkin, dengan tetap mendapatkan hasil yang optimal. *Refinement* adalah memperlakukan hewan coba secara manusiawi. (Ridwan, 2013). Ketiga prinsip etika tersebut harus dikombinasikan dengan prinsip 5F yaitu *Freedom from hunger and thirst, freedom from discomfort, freedom from pain, injury and diseases, freedom from fear and distress, dan freedom to express natural behavior*

Menurut Deklarasi Helsinki, peneliti berkewajiban melindungi kehidupan, kesehatan, harga diri, integritas, otonomi, privasi, dan kerahasiaan dari subjek penelitian. Selain itu, pelaksanaan penelitian kesehatan juga harus dilakukan dengan hati-hati apabila dapat merusak lingkungan. Oleh sebab itu sebuah penelitian dilakukan harus memiliki *ethical clearance* dimanapun peneliti itu berada.