

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimental secara *in vivo* dengan *post test only* dan *controlled group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak kelapa sawit dalam mikrosfer kitosan terhadap kadar CSF-1 ginjal pada hewan coba dengan kondisi NTA untuk mencegah GGA. Rancangan penelitian secara sistematis akan dijelaskan pada gambar 4.1.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kriteria sebagai berikut:

4.2.1. Kriteria Inklusi

Yang termasuk kriteria inklusi diantaranya:

- Jenis hewan coba adalah mencit (*Mus musculus*) tipe BALB-C
- Jenis kelamin yang digunakan adalah jantan
- Memiliki usia 2-3 bulan
- Memiliki berat badan 20-30 gram
- Bergerak aktif

4.2.2. Kriteria Eksklusi

Yang termasuk kriteria eksklusi diantaranya:

- Mengalami infeksi
- Mengalami inflamasi kronis
- Mengalami kanker

d. Mengalami autoimun

Hewan coba dalam penelitian ini dibagi ke dalam enam kelompok dimana terdapat kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan empat kelompok perlakuan.

Jumlah hewan coba yang digunakan untuk masing-masing kelompok diperoleh melalui perhitungan dengan rumus berikut (Federer, 1995):

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

dimana,

t : jumlah perlakuan

r : besar sampel tiap kelompok

Berdasarkan hasil perhitungan maka jumlah hewan coba yang digunakan dalam setiap kelompok adalah empat ekor. Sehingga jumlah hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor.

Sebanyak 24 hewan coba dibagi ke dalam enam kelompok (KN, KP, P1, P2, P3, dan P4). Pembagian dilakukan secara acak dengan ketentuan sebagai berikut:

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok	Jumlah	Perlakuan
KN	5	Tanpa perlakuan
KP	5	Gentamicin 0,14 mg/gBB i.p selama 7 hari
P1	5	Gentamicin 0,14 mg/gBB i.p selama 7 hari, dilanjutkan dengan mikrosfer minyak kelapa sawit oral 0,14 mg/gBB selama 14 hari
P2	5	Gentamicin 0,14 mg/gBB i.p selama 7 hari, dilanjutkan dengan mikrosfer minyak kelapa sawit oral 0,21 mg/gBB selama 14 hari
P3	5	Gentamicin 0,14 mg/gBB i.p selama 7 hari, dilanjutkan dengan minyak kelapa sawit oral 0,14 mg/gBB selama

P4	5	14 hari Gentamicin 0,14 mg/gBB i.p selama 7 hari, dilanjutkan dengan minyak kelapa sawit oral 0,21 mg/gBB selama 14 hari
----	---	---

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah mikrosfer minyak kelapa sawit dengan dosis 0,14 mg/gBB dan 0,21 mg/gBB serta pemberian minyak kelapa sawit dengan dosis 0,14 mg/gBB dan 0,21 mg/gBB.

4.3.2. Variabel Terikat

Yang menjadi variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar CSF-1 di jaringan ginjal setelah pemberian mikrosfer minyak kelapa sawit dan pemberian minyak kelapa sawit.

4.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, jenis spesies, frekuensi, jumlah dan jenis makanan yang diberikan, serta kondisi lingkungan. Jenis kelamin yang digunakan adalah jantan karena kadar CSF-1 di sirkulasi dapat dipengaruhi ketika kondisi ovulasi dan kehamilan (Hume dan Kelli, 2012). Jenis makanan dan minuman serta kondisi lingkungan harus dijaga agar tidak memicu terjadinya infeksi, inflamasi, kanker, dan autoimun.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 2 bulan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia untuk proses uji fitokimia dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis), Laboratorium Farmasetika untuk proses pembuatan kitosan berat molekul rendah dan mikrosfer, Laboratorium Farmasi untuk

pemeliharaan hewan coba, serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk proses pengukuran kadar CSF-1. Penelitian juga dilakukan di Laboratorium Kimia Fisika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya untuk proses pengukuran berat molekul kitosan dan di Laboratorium Fisika Instrumen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang untuk proses evaluasi bentuk mikrosfer.

4.5. Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan tahapan penelitian diantaranya adalah:

Tabel 4.2 Tabel Alat dan Bahan/Instrumen Penelitian

Tahapan penelitian	Alat	Bahan
Pengondisian dan pemeliharaan hewan coba	Kandang beserta tutup kandang, botol minum, wadah makan, timbangan.	Pakan mencit, air minum, sekam kayu.
Induksi GGA	Sprit 1 cc, jarum suntik, sarung tangan.	Gentamicin sediaan ip, <i>alcohol swab</i>
Pengukuran kadar Serum kreatinin mencit setelah induksi GGA	Sprit 1 cc, jarum suntik, sarung tangan, <i>venoject tubes</i> , label, kuvet, spektrofotometer (Biosystem tipe A15).	<i>Alcohol swab</i> , heparin
Uji separasi komponen minyak kelapa sawit	Gelas ukur 20 mL, gelas kaca (<i>chamber</i>) beserta tutupnya, plat KLT dari <i>silica gel</i> , lampu UV-Vis dengan panjang gelombang 254 nm, pipa kapiler, cawan porselen.	Minyak kelapa sawit, n-heksan, isopropanol
Tahapan penelitian	Alat	Bahan
Pembuatan mikrosfer minyak kelapa sawit	Gelas beaker, neraca analitik, batang pengaduk, <i>stirrer</i> , desikator vakum, kertas saring whatman nomor 40, batang pengaduk, <i>Scanning Elctrosopy Microscope (SEM)</i>	Kitosan berat molekul rendah, glutaraldehyd 25%, minyak kelapa sawit, asam asetat 1%, petroleum eter, aquades
Pemberian mikrosfer minyak kelapa sawit	Neraca analitik, gelas beaker, gelas ukur, batang pengaduk, batang sonde, spuit 1 cc	Mikrosfer minyak kelapa sawit, aquades

Pemberian minyak kelapa sawit	Gelas ukur, batang sonde, spuit 1 cc	Minyak kelapa sawit
Pembedahan dan pengambilan sampel darah	Neraca analitik, <i>venoject tubes</i> , label, gunting bedah, pinset, papan bedah, sarung tangan, masker, spuit 1 cc, jarum, pin dan seperangkat set anestesi eter	Eter, heparin, alkohol 70%
Pengukuran kadar CSF-1 darah	Labu ukur 100 mL, <i>venoject tubes</i> , <i>microplate reader</i> , dan mikropipet, incubator dengan suhu 37°C, kulkas dengan suhu 4°C dan -20°C, sentrifuga, sonikator, <i>microwellplate</i>	kit CSF-1 mencit, 0,01 M TBS, PBS, Buffer RIPA

4.6. Definisi Operasional

- a. Minyak Kelapa Sawit (*Crude Palm Oil/CPO*) merupakan hasil ekstraksi buah kelapa sawit yang salah satu kandungannya berupa vitamin E dan beta karoten sebagai anti oksidan. CPO yang digunakan dalam penelitian ini adalah CPO dari PT SMART dimana CPO tersebut berasal dari kebun kelapa sawit di Sumatera dan Bangka dengan rata-rata umur tanaman 7-18 tahun.
- b. Kitosan adalah polimer alami yang berasal dari cangkang hewan *Crustacea*. Kelas kitosan yang digunakan adalah untuk makanan dan obat yang berasal dari cangkang udang dan yang dibeli dari Phyedumedia Malang dengan derajat deasetilasi sebesar 87,5%.
- c. Kitosan Berat Molekul Rendah adalah kitosan dengan berat molekul 19-70 kDa.
- d. Mikrosfer yang digunakan merupakan mikrosfer dengan diameter 180-700 μm yang diformulasi melalui metode *crosslinking* dengan agen S-TPP sebagai agen *cross linker*.

- e. Nekrosis Tubular Akut (NTA) adalah kondisi terjadinya kerusakan maupun kematian sel tubulus yang ditandai melalui bentukan nekrosis sel tubulus pada preparat histologi setelah induksi dengan gentamicin 0,14 mg/gBB secara intraperitoneal selama 7 hari.
- f. Gentamicin adalah antibiotik golongan aminoglikosida untuk mengatasi bakteri gram negatif dan memiliki efek nefrotoksik dimana gentamicin yang digunakan berasal dari Indofarma[®] dan diambil dari Apotek Sutami dengan kekuatan 40mg/mL.
- g. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) tipe BALB-C yang memiliki jenis kelamin jantan dengan umur 2-3 bulan dan berat badan 20-30 gram. Kriteria tersebut digunakan karena dapat menggambarkan model gagal ginjal akut ataupun NTA.
- h. CSF-1 merupakan faktor pertumbuhan yang ada dalam darah dan jaringan dimana ekspresinya mempengaruhi aktivasi dari makrofag. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran CSF-1 di jaringan ginjal berupa data dengan skala numerik dan dengan satuan ng/L. Dalam pengujian, *kit* CSF-1 yang digunakan adalah *kit* CSF-1 mencit dari *Elabscience*[®].

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Uji Separasi Komponen Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit (CPO) dilakukan uji KLT menggunakan eluen n-hexan dan isopropanol dengan perbandingan 98:2 sebanyak 20 mL yang dicampur dalam gelas kaca. CPO ditimbang 2 mg dan kemudian dilarutkan dalam n-hexan secukupnya (\pm 2 mL). Setelah larut, ditotolkan larutan pada plat silika yang kemudian diletakkan dalam gelas kaca berisi eluen. Proses eluasi ditunggu hingga eluen bergerak mencapai tanda batas yang ada di plat KLT.

Selama proses eluasi, gelas kaca ditutup. Setelah itu dihitung nilai R_f (*Retardation Factor*) yang diperoleh (Chandrasekaram, 2009).

Nilai R_f dapat dihitung melalui persamaan (Bele dan Anubha, 2011):

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda dengan batas bawah}}{\text{Jarak batas atas dan batas bawah}}$$

4.7.2. Pembuatan Kitosan Berat Molekul Rendah

Dibuat larutan kitosan 1% b/v dalam HCl 1 M. Dalam pembuatan larutan kitosan 1% b/v maka ditimbang kitosan sebanyak 8 gram dan kemudian dilarutkan dalam HCl 1 M sebanyak 800 mL. Larutan kemudian diaduk menggunakan *stirrer* selama 2 jam dengan kecepatan pengadukan 700 rpm (rotasi per menit) dan dengan suhu konstan $\pm 70^\circ\text{C}$. Setelah itu dilakukan netralisasi dengan larutan NaOH 1 N hingga diperoleh nilai pH sebesar 6,5-7. Kemudian dilakukan penyaringan dengan pompa vakum, dibilas dengan aquades, dan dikeringkan di oven dengan suhu 40°C (Paramita dkk, 2012 dan Qinna *et al.*, 2015).

4.7.2.1. Pengukuran Berat Molekul Kitosan

Untuk mengetahui berat molekul kitosan, maka dilakukan pengukuran berat molekul dengan menggunakan viskometer. Prosedur yang pertama dilakukan adalah dengan ditimbang kitosan sebanyak 0,00 gram; 0,02 gram; 0,04 gram; 0,06 gram; dan 0,08 gram yang kemudian dilarutkan dalam asam asetat 1% sebanyak 100 mL hingga diperoleh konsentrasi berturut-turut 0,00%; 0,02%; 0,04%; 0,06%; dan 0,08%. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam viskometer dan diukur waktu alirnya. Setelah itu diukur nilai viskositas spesifiknya melalui persamaan *Mark Houwink*, yaitu (Paramita dkk, 2012):

$$\eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0}$$

Keterangan (Paramita dkk, 2012):

η_{sp} = Viskositas spesifik

t = Waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan sampel (detik)

t_0 = Waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan solven (detik)

Untuk memperoleh data berat molekul maka dibuat persamaan garis antara $\eta_{sp}/\text{konsentrasi}$ terhadap konsentrasi. Setelah itu dihitung viskositas intrinsik dengan mencari titik pada grafik yang menunjukkan nilai konsentrasi = 0. Kemudian dihitung berat molekulnya melalui persamaan *Mark Houwink*, yaitu (Paramita dkk, 2012):

$$[\eta] = kM^\alpha$$

Keterangan (Pearce *et al.*, 2015):

$[\eta]$ = Viskositas intrinsik

M = Berat Molekul (g/mol)

k = Konstanta pelarut ($0,56 \times 10^{-4}$)

α = Konstanta (1,02)

Viskositas merupakan ukuran yang menyatakan ketahanan benda cair terhadap gaya geser yang dapat ditentukan melalui pengukuran laju aliran sampel. Untuk menentukan berat molekul suatu polimer dapat dilakukan melalui perhitungan yang membandingkan antara viskositas suatu larutan polimer dengan viskositas pelarut murni (Nazwa dkk., 2014). Viskositas intrinsik merupakan besaran yang menyatakan kemampuan suatu polimer untuk meningkatkan viskositas larutan yang dihitung dari kurva perbandingan viskositas spesifik dan konsentrasi yang diekstrapolasi dengan nilai konsentrasi = 0 agar pengaruh konsentrasi dapat diabaikan dan nilai viskositas intrinsik akan semakin meningkat ketika derajat deasetilasi atau berat molekul semakin tinggi (Emmawati dkk., 2007).

4.7.3. Pembuatan Mikrosfer

Untuk membuat mikrosfer minyak kelapa sawit dengan kitosan, maka yang pertama dilakukan adalah menyiapkan kitosan sebanyak 1.5 gram yang kemudian dilarutkan dalam 50 ml asam laktat 2.4%. Campuran kitosan dan asam laktat kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 1 jam hingga terbentuk larutan. Kemudian minyak kelapa sawit sebanyak 10 mL ditambahkan kedalam larutan kitosan dan diaduk selama 15 menit menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm. Setelah itu disiapkan 120 ml larutan STPP 5% b/v dan ditambahkan campuran kitosan-minyak kelapa sawit menggunakan spuit 18 G *needle* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Kemudian ditambahkan formaldehida 1.3% sampai terbentuk partikel ($\pm 3\text{mL}$), kemudian diaduk lagi menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan kertas saring whatmann No 1 dan dibilas dengan 10 ml aseton. Kemudian mikrosfer ditambahkan dengan 20 mL aseton dan dicampur selama beberapa menit. Hasil pencampuran kemudian dikeringkan dalam *petridisk* selama 18 jam di suhu ruangan (Kumar *et al.*, 2012).

4.7.3.1. Evaluasi Bentuk Mikrosfer

Bentuk dari mikrosfer dievaluasi melalui alat *Scanning Electroscopy Microscope* (SEM) melalui ditambahkannya sejumlah mikrosfer ke dalam wadah sampel yang terdapat pada perangkat SEM dan kemudian wadah sampel ditempatkan di alat. Tegangan percepatan yang digunakan adalah sebesar 20 kV dengan tekanan 88 Pa dan dengan perbesaran 5.000 kali (Marzuki, 2012).

4.7.3.2. Evaluasi Toksisitas Aseton

Minyak kelapa sawit dalam bentuk mikrosfer diformulasi dengan menggunakan aseton untuk membilas sediaan di tahap akhir. Aseton yang digunakan adalah sebanyak 30 mL dimana 10 mL digunakan untuk membilas saat penyaringan dan 20mL digunakan untuk pembilasan terakhir sebelum dilakukan pengeringan (Kumar *et al.*, 2012).

Aseton merupakan senyawa kimia yang secara normal terdapat dalam tubuh sebagai hasil dari metabolisme asam lemak. Secara fisiologis, kadar aseton dalam tubuh akan meningkat seiring dengan meningkatnya kebutuhan energi. Aseton memiliki karakteristik yang mudah terbakar, berupa gas bertekanan tinggi, dan berbahaya terhadap api dan ledakan. Selain itu aseton juga memiliki kemampuan yang mudah menguap sehingga disebut sebagai zat volatil. Pemberian aseton dapat menyebabkan menciit kehilangan kesadarannya 35 menit kemudian dengan pemberian sebanyak 100-200 mg/L. Dosis toksisitas akut dari aseton yang dinyatakan dalam dosis Ld_{50} dari aseton untuk menciit dengan pemberian secara oral adalah sebesar 5.200 mg/KgBB atau setara dengan 5,2 mg/gBB. Selain itu, diketahui pula dosis yang aman untuk toksisitas sistemik pada menciit adalah sebesar 2.300 mg/KgBB/hari atau setara dengan 2,3 mg/gBB/hari untuk menciit jantan dalam pemberian selama 13 minggu. Dosis ini dinyatakan sebagai dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan (*American Chemistry Council Acetone Panel*, 2003).

Karakteristik aseton yang mudah menguap dapat menyebabkan semakin berkurangnya kadar aseton dalam mikrosfer ketika proses pengeringan selama 18 jam dan proses penyimpanan sediaan. Namun selama perlakuan perlu diamati gejala klinis yang mungkin terjadi pada kondisi toksisitas aseton. Kondisi toksisitas yang ditemukan akibat aseton adalah mengantuk dan iritasi

namun efek ini hanya muncul ketika aseton digunakan dalam dosis tinggi (Putra, 2003).

4.7.3.3. Evaluasi Toksisitas Formaldehid

Minyak kelapa sawit yang diformulasi dalam bentuk mikrosfer membutuhkan senyawa formaldehid dengan kekuatan 1,3% sebagai pembentuk partikel. Kadar yang digunakan dalam formulasi adalah sebanyak 3 mL (Kumar *et al.*, 2012)

Formaldehid dapat dimetabolisme ditubuh membentuk asam format yang toksik. Dosis toksik formaldehid untuk paparan akut dengan pemberian secara oral pada tikus dinyatakan dalam bentuk dosis Ld_{50} yaitu sebesar 800 mg/KgBB. Ketika formaldehid dipaparkan pada tikus dalam jangka waktu singkat, maka telah ditentukan satuan dosis yang tidak menimbulkan efek merugikan adalah sebesar 25mg/KgBB/hari dimana pada studi ini paparan dilakukan selama 4 minggu. Studi lain menjelaskan pula bahwa paparan jangam panjang formaldehid yaitu selama 2 tahun sebesar 15 mg/KgBB pada tikus tidak menunjukkan adanya efek merugikan (WHO, 2005). Dalam data tersebut, hanya terdapat data dosis toksik tikus sehingga perlu dilakukan konversi dosis untuk menerapkan dosis tersebut pada mencit melalui perhitungan berikut,

LD₅₀ formaldehid pada mencit

Ld_{50} pada tikus : 800 mg/KgBB setara dengan 0,8 mg/gB

Faktor konversi dosis tikus ke mencit : 0,14 untuk konversi dosis dari 200 gram tikus ke 20 gram mencit

Dosis untuk 200 gram tikus = 0,8 mg/gBB x 200 gBB
= 160 mg

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk 20 gram mencit} &= 0,14 \times 160 \text{ mg} \\ &= 22,4 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Dosis untuk mencit} = 1,12 \text{ mg/gBB mencit}$$

Dosis aman formaldehid untuk paparan akut pada mencit

$$\begin{aligned} \text{Dosis aman paparan akut pada tikus} &: 25 \text{ mg/KgBB/hari (setara dengan} \\ &0,025 \text{ mg/gBB/hari) selama 4 minggu} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor konversi dosis} &: 0,14 \text{ untuk konversi dosis dari 200} \\ &\text{gram tikus ke 20 gram mencit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk 200 gram tikus} &= 0,025 \text{ mg/gBB/hari} \times 200 \text{ gBB} \\ &= 5 \text{ mg/hari selama 4 minggu} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk 20 gram mencit} &= 0,14 \times 5 \text{ mg/hari} \\ &= 0,7 \text{ mg/hari selama 4 minggu} \end{aligned}$$

$$\text{Dosis untuk mencit} = 0,035 \text{ mg/gBB/hari selama 4 minggu}$$

Dosis aman formaldehid untuk paparan kronis

$$\begin{aligned} \text{Dosis aman paparan akut pada tikus} &: 15 \text{ mg/KgBB/hari (setara dengan} \\ &0,015 \text{ mg/gBB/hari) selama 2 tahun} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Faktor konversi dosis} &: 0,14 \text{ untuk konversi dosis dari 200} \\ &\text{gram tikus ke 20 gram mencit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk 200 gram tikus} &= 0,015 \text{ mg/gBB/hari} \times 200 \text{ gBB} \\ &= 3 \text{ mg/hari selama 2 tahun} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk 20 gram mencit} &= 0,14 \times 3 \text{ mg/hari} \\ &= 0,42 \text{ mg/hari selama 2 tahun} \end{aligned}$$

$$\text{Dosis untuk mencit} = 0,021 \text{ mg/gBB/hari selama 2 tahun}$$

Formaldehid juga memiliki titik didih rendah dan bersifat mudah menguap sehingga memungkinkan terjadinya penurunan kadar formaldehid dalam sediaan mikrosfer. Selain dilakukan perhitungan kadar formaldehid dalam mikrosfer, perlu dilakukan pula pengamatan gejala klinis dari toksisitas

formaldehid pada mencit dimana gejala toksisitas yang mungkin muncul adalah nyeri perut, mual muntah, pendarahan saluran pencernaan, dan diare (Yulisa, 2014).

4.7.4. Uji efektivitas Mikrosfer Minyak Kelapa Sawit

4.7.4.1. Induksi

Sebelum dilakukan pemberian minyak kelapa sawit baik dalam bentuk mikrosfer kitosan ataupun tidak, dilakukan induksi agar diperoleh kondisi NTA yang merupakan kondisi awal sebelum terjadinya GGA. Hewan coba yang akan diinduksi adalah KP, P1, P2, P3, dan P4. Dosis yang diperlukan untuk induksi GGA menggunakan gentamicin adalah sebanyak 0,14 mg/gBB yang diberikan secara intraperitoneal selama 7 hari dimana gentamicin dengan dosis 40-200 mg/KgBB dapat menginduksi GGA pada tikus wistar selama 4-10 hari pemberian. Dosis yang umum digunakan untuk induksi pada tikus adalah 100 mg/KgBB. Selama induksi, hewan coba diberikan pakan dan minum standar (Singh *et al.*, 2012). Dosis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil konversi dosis dari hewan coba tikus ke mencit melalui faktor konversi sebesar 0,14 untuk mencit dengan berat 20 gram dari dosis tikus dengan berat 200 gram sehingga diperoleh perhitungan,

$$\text{Dosis untuk Tikus 200 gram} = 100 \text{ mg/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg} = 20 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis untuk Mencit 20 gram} &= 20 \text{ mg} \times 0,14 = 2,8 \text{ mg untuk tiap 20 gram} \\ &\text{mencit} \\ &= 0,14\text{mg/gBB} \end{aligned}$$

4.7.4.2. Pengamatan Histologi

Sebelum dilakukan pemberian terapi, dilakukan pengamatan histologi ginjal pada sebagian mencit, yaitu 4 ekor mencit yang telah diinduksi.

Pengamatan histologi ini dilakukan untuk memastikan terjadinya kondisi NTA pada hewan coba.

Pengamatan histologi ginjal yang digunakan adalah dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin yang kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya. Jumlah sel tubulus proksimal yang mengalami nekrosis dihitung melaalui 10 lapang pandang tiap sampel. Sel tubulus yang mengalami nekrosis dapat dibedakan dengan sel lain dimana tanda dari sel yang nekrosis adalah mengalami kehilangan integritas sel dan terpecahnya isi sel sehingga terjadi reaksi inflamasi lokal, peningkatan eosinofil, penampakan lebih homogen, *myelin figure* lebih menonjol, sitoplasma tervakuolisasi, dan perubahan nukleus (*karyolysis, pyknosis, karyorrhexis*) (Kumar, 2015).

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin akan menghasilkan warna biru pada bagian nukleus sel, warna merah atau merah muda pada sitoplasma, warna merah muda pada serat kolagen, dan merah muda pada otot. Terdapat beberapa tahapan dalam pengujian histopatologi, yaitu tahapan deparafinasi, rehidrasi, dan dehidrasi. Tahapan deparafinasi dilakukan dengan memasukkan preparat kedalam xilol bertingkat 1-3 dimana masing-masing selama 5 menit. Tahap selanjutnya adalah rehidrasi yang dilakukan dengan memasukkan preparat kedalam etanol bertingkat dari etanol absolut 1-3, etanol 95, 90, 80 dan 70% dimana masing-masing dilakukan selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan perendalan preparat dalam akuades selama 5 menit dan kemudian preparat dimasukkan dalam pewarna hematoxylen hingga diperoleh hasil warna terbaik selama ± 10 menit. Preparat lalu dicuci selama 30 menit menggunakan air mengalir dan dilanjutkan dengan dibilas menggunakan akuades. Setelah dimasukkan ke dalam pewarna hematoxylen, preparat dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit. Berikutnya dilakukan tahapan dehidrasi memasukkan preparat kedalam seri etanol bertingkat dari

80, 90 dan 95% hingga etanol absolut 1-3. Tahap dehidrasi kemudian dilanjutkan dengan clearing yaitu memasukkan preparat pada xilol 1 dan 2 yang dilanjutkan dengan pengeringan. Prosedur terakhir yang dilakukan adalah *mounting* dengan *entellan* (Yustika dkk, 2013).

Sel yang diamati pada histologi ginjal ini adalah sel tubulus proksimal dimana kerusakan sel akibat induksi dengan Gentamicin paling banyak terjadi di tubulus proksimal karena Gentamicin direabsorpsi di tubulus proksimal ginjal. Setelah memasuki sel tubulus proksimal, gentamicin akan terakumulasi di lisosom yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang lebih banyak pada nefron bagian tersebut (Leung *et al.*, 2004).

4.7.4.3. Pemberian Terapi

Setelah dilakukan induksi selama 7 hari. P1 dan P2 diberikan mikrosfer dengan dosis berturut-turut 0,14 dan 0,21 mg mikrosfer/gBB tiap hari secara oral. P3 dan P4 masing-masing diberikan minyak kelapa sawit dengan dosis berturut-turut 0,14 dan 0,21 mg minyak kelapa sawit/gBB tiap hari secara oral. Dosis perlakuan yang digunakan merupakan penyesuaian dari penelitian sebelumnya karena penggunaan minyak kelapa sawit yang berasal dari daunnya memiliki efek proteksi yang cukup baik terhadap ginjal pada tikus wistar yang mengalami diabetes dengan dosis 100 mg/KgBB selama 35 hari namun efek proteksi menurun dengan peningkatan dosis minyak kelapa sawit menjadi 200 mg/KgBB (Tan *et al.*, 2011). Perlakuan dilakukan selama 2 minggu karena penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa struktur tubulus sudah kembali normal pada 2 minggu setelah GGA dengan pengembalian fungsi ginjal terjadi 3 minggu setelah GGA pada ikan *N. furzeri* (Hoppe *et al.*, 2015). Penelitian lainnya menyatakan bahwa terjadi regenerasi ginjal pada 2 minggu setelah GGA. Penelitian ini dilakukan pada mencit (Berger *et al.*, 2014). KP

adalah kelompok mencit yang telah diinduksi namun tidak diberi perlakuan apa-apa sedangkan KN tidak diinduksi dan tidak diberi perlakuan apa-apa.

Pemberian mikrosfer dan minyak kelapa sawit pada KP1, KP2, KP3, dan KP4 yaitu dengan volume berturut-turut sebanyak 0,4; 0,6; 0,2; dan 0,3 mL karena kapasitas maksimal lambung mencit dalam sehari adalah sebesar 1 mL (Mulyatmo, 2014). Mikrosfer dan minyak kelapa sawit didispersikan terlebih dahulu dengan CMC Na untuk mempermudah proses pemberian.

4.7.4.4. Pembedahan Hewan Coba

Setelah selesai perlakuan selama 14 hari, mencit dibedah untuk dilakukan pengambilan organ ginjal. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dianestesi dengan menggunakan eter. Proses anestesi mencit dengan eter dilakukan menggunakan kapas yang dibasahi dengan eter. Kapas tersebut dimasukkan ke dalam kaleng kosong. Kemudian mencit yang akan dibedah dimasukkan ke dalam kaleng dan ditutup. Diamkan selama 1 menit (hingga mencit mati). Setelah mencit dimatikan, dapat dilakukan proses pembedahan dan pengambilan organ ginjal. Pengambilan organ dilakukan dengan hati-hati agar organ dan jaringan tidak rusak (Endharti, 2007).

4.7.4.5. Pengukuran Kadar CSF-1

Jaringan ginjal diambil dan dilakukan proses preparasi jaringan lisat. Jaringan yang diinginkan sebanyak 500 mg dicuci dengan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) sebanyak 1 kali untuk menghilangkan darahnya lalu ditambah 500 μ L *buffer* RIPA (larutan *buffer* yang terdiri dari tris HCl, Triton X-100, Sodium deoxycholate, SDS, EDTA, NaF, dan H₂O) tiap 10 mg jaringan. Untuk proses lisis, sampel disonikasi selama 2-5 menit dengan kekuatan 180 watts. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 9.700 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C sehingga terbentuk sampel jaringan (Proteintech, 2014).

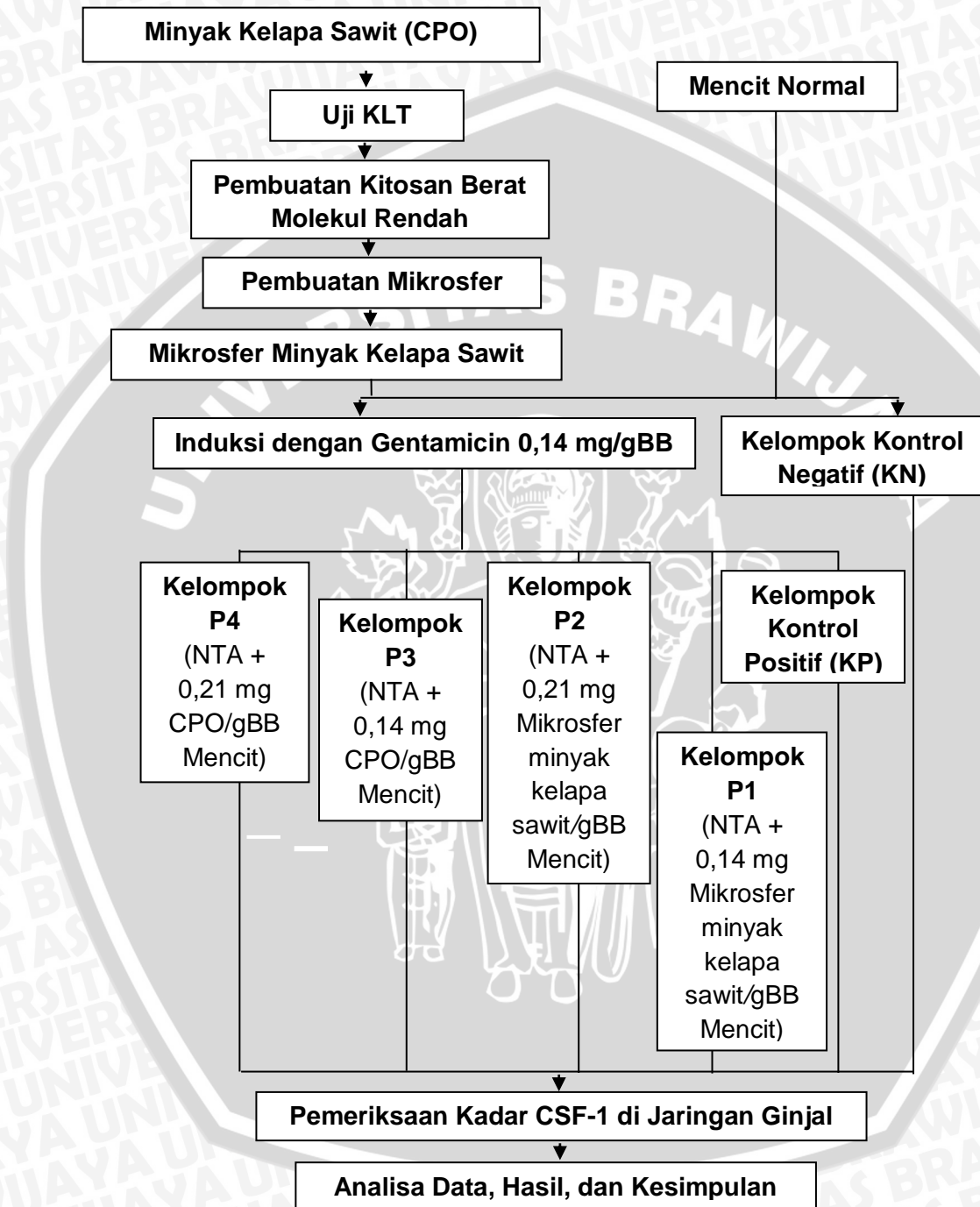
Sampel, blanko, dan standar disiapkan sebanyak 100 μL di dalam wadah. Wadah yang berisi larutan blanko kemudian ditambahkan dengan pelarut standar dan pelarut blanko. Larutan diaduk secara perlahan dan kemudian diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C . Setelah itu, dibuang cairan yang terdapat pada masing-masing wadah dan lalu ditambahkan 100 μL antibodi deteksi terbotinilasi. Tiap wadah diketuk perlahan agar campuran homogen dan kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C (Elabscience, 2015).

Tahap selanjutnya adalah tahap pencucian yang dilakukan dengan mendiamkan tiap wadah sejenak dan kemudian dilakukan pencucian menggunakan dapar pencuci sebanyak 350 μL . Ulangi proses tersebut sebanyak tiga kali. Untuk menghilangkan dalam wadah maka diamkan wadah sejenak di udara terbuka pada proses pencucian terakhir dan lalu balikkan wadah dan ketukkan diatas kertas saring untuk menyempurnakan proses pencucian (Elabscience, 2015).

Setelah itu ditambahkan larutan kerja penghubung sebanyak 100 μL , tutup wadah dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C . Kemudian, dilakukan kembali tahap pencucian sebanyak lima kali. Selanjutnya dilakukan penambahan larutan substrat sebanyak 90 μL pada masing-masing wadah dan lalu tiap wadah di tutup. Masing-masing wadah setelah itu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C dan kemudian ditambahkan larutan pemberhenti sebanyak 50 μL pada masing-masing wadah. Penambahan larutan pemberhenti akan menyebabkan perubahan warna larutan menjadi kuning. Tahap terakhir yang dilakukan adalah pembacaan nilai serapan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm (Elabscience, 2015).

4.8. Skema Penelitian

Skema dari penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

4.9. Analisis Data

Setelah penelitian ini selesai dilakukan, data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji statistik parametrik *oneway* ANOVA untuk mengetahui pengaruh pemberian mikrosfer minyak kelapa sawit dengan dan tanpa pembawa kitosan terhadap kadar CSF-1 di jaringan ginjal pada kondisi NTA untuk mencegah GGA. Apabila data tidak memenuhi persyaratan untuk dianalisis menggunakan uji statistik parametrik, maka uji statistik alternatif yang dilakukan adalah non-parametrik *kruskal-wallis test*.

