

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif dengan desain eksperimental murni (*true experimental design*). Penelitian dilakukan di laboratorium secara *in vivo* untuk mengetahui efek pemberian minyak kelapa sawit dan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit terhadap kadar MDA di ginjal pada *Mus musculus* dengan NTA karena induksi gentamisin. Penelitian dilakukan dengan *post-test only* dan *controlled group design*.

#### 4.2. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan *Mus musculus* sebagai sampel hewan coba dengan kriteria:

##### 1. Kriteria inklusi:

- a. Mencit putih (*Mus musculus* L) galur BALB-C
- b. Jantan
- c. Usia 2-3 bulan
- d. Berat badan 20-30 gram
- e. Bergerak aktif

##### 2. Kriteria eksklusi:

- a. Memiliki kelainan anatomi
- b. Mengalami hypovolemia
- c. Mengalami obstruksi saluran kemih

Penelitian ini menggunakan 6 kelompok yaitu 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Besar sampel pada masing-masing kelompok dihitung menggunakan rumus Federer (Federer, 1995):

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : besar sampel tiap kelompok

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan bahwa besar sampel tiap kelompok minimal adalah 4 ekor. Dengan demikian jumlah total *Mus musculus* yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 24 ekor.

Pembagian kelompok penelitian dari 24 *Mus musculus* dalam 6 kelompok (KN, KP, P1, P2, P3, P4) secara acak dengan ketentuan sebagai berikut:

**Tabel 4.1. Desain Eksperimen dan Hewan Coba**

Kelompok	Jumlah	Perlakuan
Kontrol Negatif (KN)	4	Tanpa perlakuan
Kontrol Positif (KP)	4	Gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari
Perlakuan 1 (P1)	4	Gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari, dilanjutkan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit p.o 0,072 mg/gBB selama 14 hari
Perlakuan 2 (P2)	4	Gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari dilanjutkan dengan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit p.o 0,107 mg/gBB selama 14 hari
Perlakuan 3 (P3)	4	Gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari, dilanjutkan minyak kelapa sawit p.o 0,14 mg/gBB selama 14 hari
Perlakuan 4 (P4)	4	Gentamisin i.p 0,14 mg/gBB selama 7 hari dilanjutkan dengan minyak kelapa sawit p.o 0,21 mg/gBB selama 14 hari



### 4.3. Variabel Penelitian

#### 4.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah gentamisin, mikrosfer minyak kelapa sawit, dan minyak kelapa sawit.

#### 4.3.2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA di ginjal *Mus musculus* dengan NTA.

#### 4.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis kelamin, jenis spesies, frekuensi pemberian makan dan minum, jumlah, waktu pemberian, dan kondisi lingkungan.

### 4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian direncanakan selama 2 bulan, dimulai bulan September tahun 2016.

### 4.5. Bahan dan Alat Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disesuaikan dengan tahapan penelitian. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

Tabel 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Tahapan Penelitian	Alat	Bahan
Pemeliharaan hewan coba	Kandang, tutup kandang, botol minum, wadah makan, sekam, timbangan	Pakan <i>Mus musculus</i> , air minum
Induksi gentamisin	S spuit 1 cc, jarum suntik i.p, sarung tangan, <i>alcohol swab</i>	Gentamisin
Perlakuan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dan minyak kelapa sawit	Neraca analitik, gelas beaker, gelas ukur, batang pengaduk, kertas perkamen, batang sonde, spuit 5 cc	Mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit, STPP, formaldehida, aseton, minyak kelapa sawit
Perlakuan minyak kelapa sawit	Gelas ukur, batang sonde, spuit 5 cc	minyak kelapa sawit dan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit
Pembedahan dan pengambilan ginjal	Neraca analitik, pot organ, label, gunting bedah, pinset, papan bedah, sarung tangan, masker, spuit, jarum, dan pin	Ketamin 100 mg/mL
Pengukuran MDA	Neraca, mortar, stamper, <i>felcon</i> , mikropipet, tip, kuvet, spektrofotometer, vorteks dan alat sentrifugasi	Buffer pospat pH 7,4, larutan TCA 100%, HCl 1 N, <i>Na-thiobarbituric acid</i> 10%, dan aquabidestilata

#### 4.6. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- 1) NTA merupakan kondisi kerusakan sel tubulus proksimal yang disebabkan oleh paparan zat toksik yaitu gentamisin 0,14 mg/gBB selama 7 hari. Kondisi ini ditandai dengan sel yang nekrosis dan hilangnya lumen tubulus pada hasil histologi ginjal yang telah diinduksi pada studi pendahuluan.
- 2) GGA merupakan kondisi kerusakan fungsi ginjal secara akut yang diakibatkan dengan adanya kondisi NTA.
- 3) Gentamisin merupakan obat golongan antibiotik yang memiliki efek samping nefrotoksik yang digunakan untuk menginduksi NTA karena peningkatan

ROS. Gentamisin yang digunakan berasal dari RSUD Koesma Tuban diproduksi oleh PT Indofarma, diberikan dengan dosis 0,14 mg/gBB selama 7 hari.

- 4) Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus L*) galur BALB-C berusia 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram karena hewan ini dapat menyimulasikan kondisi NTA setelah dilakukan induksi dengan gentamisin. *Mus musculus* diperoleh dari Malang Murine Farm.
- 5) Kitosan merupakan polimer kitin dari cangkang golongan *crustaceae* yang didapat dari toko kimia Phyedumedia Malang dengan derajat deasetilasi sebesar 87,5%.
- 6) LMWC merupakan kitosan dengan ukuran berat molekul sebesar kurang dari 70 kDa yang diperoleh dari hasil sintesis kitosan dengan proses pengadukan dalam HCl 1 N selama 2 jam.
- 7) Mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit merupakan minyak kelapa sawit yang diproses dalam bentuk sediaan mikrosfer dan polimer kitosan dengan metode emulsi *crosslinking*. Mikrosfer kitosan memiliki ukuran 180-700  $\mu\text{m}$  dan bentuk *spheric*. Apabila bentuk tidak *spheric* maka mikrofer akan mudah membentuk agregasi dan mengganggu proses distribusi ke ginjal.
- 8) Metode *crosslinking* merupakan metode untuk pembuatan mikrosfer kitosan dengan membentuk ikatan silang antara gugus kationik yang dimiliki oleh kitosan dengan gugus anionik yang dimiliki oleh STPP yang selanjutnya mengkapsulasi minyak kelapa sawit dengan bantuan pengadukan dengan *magnetic stirrer*.
- 9) Minyak kelapa sawit merupakan minyak dari buah kelapa sawit yang mengandung vitamin E sebagai antioksidan yang diperoleh dari PT SMART yang berasal dari kebun kelapa sawit di Bangka dan BangkaSumatera dengan usia tanaman 7-18 tahun.

10) MDA merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid pada ginjal *Mus musculus* yang diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-VIS berdasarkan reaksi warna dengan TBA. Nilai MDA yang diperoleh termasuk dalam skala data numerik rasio dengan satuan nmol/mL.

#### 4.7. Prosedur Penelitian

##### 4.7.1. Pembuatan Kitosan Berat Molekul Rendah

Pertama-tama disiapkan HCl 1 M sebesar 1 liter. Selanjutnya ditimbang kitosan sebanyak 10 gram. Setelah itu kitosan dimasukkan ke dalam HCl dalam gelas beaker dan diaduk selama 2 jam dengan suhu 70°C dengan kecepatan 700 rpm. Selanjutnya, dilakukan proses netralisasi dengan larutan NaOH 1 N hingga pH 6,5-7,0. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan pompa vakum dan dicuci dengan aquades. Untuk memperoleh hasil yang kering, maka pengeringan dilakukan di oven dengan suhu 40°C selama 24 jam (Paramita *et al.*, 2012 dan Qinna *et al.*, 2015).

##### 4.7.2. Uji Evaluasi LMWC

LMWC dievaluasi menggunakan metode Viscometer Ostwalt. Larutan kitosan disiapkan dengan konsentrasi 0,00;0,02;0,04;0,06; dan 0,08 % b/v dalam larutan asam asetat 1% sebanyak 100 mL. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam alat viskometer Ostwald dan dilakukan perhitungan berat molekul melalui persamaan (Paramita *et al.*, 2012):

$$n_{sp} = (t-t_0)/t_0$$

Keterangan:

$n_{sp}$  = viskositas spesifik (detik)

$t$  = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan sampel (detik)

$t_0$  = waktu yang diperlukan untuk mengalirnya larutan solven (detik)

Berat molekul kitosan diukur berdasarkan viskositas instrinsik ( $[\eta]$ ). Data yang diperoleh selanjutnya dibuat grafik  $n_{sp}/C$  terhadap  $C$ . viskositas instrinsik merupakan titik pada grafik yang menunjukkan nilai  $C = 0$  karena pada kondisi ini antara polimer kitosan dengan pelarutnya tidak saling mengganggu. Berat molekul ditentukan dengan persamaan Mark-Houwink yaitu (Ghosh, 2006 dan Paramita *et al.*, 2012):

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

Keterangan:

- $[\eta]$  = viskositas intrinsik  
 $k$  = konstanta pelarut ( $3,5 \times 10^{-4}$ )  
 $\alpha$  = konstanta (1,02)  
 $M$  = berat molekul

#### 4.7.3. Uji Separasi Senyawa-Senyawa dalam Minyak Kelapa Sawit

Uji fitokimia dilakukan dengan uji KLT menggunakan eluen n-heksan: isopropanol (98:2) sebanyak 20 mL dan diamati dalam UV-Vis dengan panjang gelombang 254 nm, ditandai noda yang terlihat dan dilakukan perhitungan  $R_f$ . Selanjutnya dilakukan perbandingan nilai  $R_f$  dengan literatur (Chandrasekaram, 2009).

**Tabel 4.3. Nilai  $R_f$  Senyawa dalam Minyak Kelapa Sawit (Chandrasekaram, 2009)**

Polinutrien	Nilai $R_f$			
	Karoten	Squelen	Tokols	Sterols
Minyak Kelapa Sawit Kasar	0,76	0,74	0,34	0,21
Fitonutrien Kelapa Sawit	0,76	0,74	0,34	0,21
Terkonsentrasi Standar	0,78	0,71	0,38	0,24

#### 4.7.4. Formulasi Mikrosfer Kitosan Minyak Kelapa Sawit

LMWC ditimbang sebanyak 1,5 gram. Kemudian LMWC dilarutkan dalam 50 mL asam laktat 2,4% dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam dengan kecepatan 700 rpm. Selanjutnya ditambahkan minyak kelapa sawit sebanyak 10 mL ke dalam larutan kitosan dan kemudian diaduk kembali selama 15 menit. Kemudian disiapkan 120 mL larutan STPP 5% b/v dalam *beaker glass* dan ditambahkan campuran kitosan-minyak kelapa sawit menggunakan spuit jarum 18 G tetes demi tetes dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan formaldehida 1,3% sampai terbentuk partikel ( $\pm 3\text{mL}$ ) dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* kecepatan 700 rpm selama 15 menit. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan pompa vakum dan kertas whatmann No 1 dan dibilas menggunakan 10 mL aseton. Kemudian hasil penyaringan dikeringkan dalam cawan petri selama 5 hari pada suhu ruang (Kumar *et al.*, 2012).

#### 4.7.5. Evaluasi Mikrosfer Menggunakan SEM

Sampel ditempatkan dalam *aluminium holder* menggunakan isolasi karbon yang memiliki dua sisi yang lengket. Selanjutnya sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C selama minimal 3 jam. Kemudian sampel ditempatkan dalam lubang tempat sampel di SEM dan dinyalakan SEM dan diamati (Mitra dan Baishakhi, 2011).

#### 4.7.6. Evaluasi Toksisitas Residu Formaldehida dan Aseton

Evaluasi residu formaldehida dan aseton dilakukan dengan menbandingkan dosis yang bisa ditoleransi oleh mencit per hari dengan kandungan formaldehida dan aseton dalam sediaan yang diberikan ke mencit per hari. Perhitungan dilakukan pada lampiran 6. Selain itu juga dilakukan pemantauan gejala klinis terjadinya toksisitas formaldehida yang berupa iritasi lokal pada jaringan rongga mulut *mus musculus* (Wakefield, 2008) dan aseton

yang berupa iritasi mata dan lakrimasi pada mata. Selain itu juga dapat mengalami pembengkakan organ yang mengakibatkan rasa nyeri dan hewan coba menjadi tidak aktif bergerak (ATSDR, 1994).

#### 4.7.7. Induksi NTA

Induksi NTA dilakukan dengan menggunakan gentamisin ip 0,14 mg/gBB selama 7 hari pada sampel (sampel) karena penggunaan gentamisin 100 mg/kgBB selama 7 hari mampu menginduksi kondisi NTA yang ditandai dengan sel tubulus proksimal yang nekrosis dan hilangnya lumen tubulus proksimal pada studi pendahuluan.

#### 4.7.8. Uji Histopatologi

Dilakukan pembedahan pada 3 mencit yang telah diinduksi dengan gentamicin 0,14 mg/gBB selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan preparasi jaringan dalam bentuk *slide* dengan pengecatan HE dan diamati menggunakan mikroskop BX dengan perbesaran 400x.

#### 4.7.9. Uji Efektivitas Kelapa sawit

##### 4.7.9.1. Perlakuan

Sampel dalam P1 yang telah diinduksi NTA diberikan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,072 mg/gBB, P2 yang telah diinduksi NTA diberikan mikrosfer kitosan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,107 mg/gBB, P3 yang telah diinduksi NTA diberikan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,14 mg/gBB, dan P4 yang telah diinduksi NTA diberikan minyak kelapa sawit dengan dosis 0,21 mg/gBB karena penggunaan minyak kelapa sawit yang berasal dari daunnya memiliki efek proteksi ginjal yang cukup baik pada tikus dengan dosis 100 mg/kgBB dan pada dosis 200 mg/kgBB tidak menghasilkan hasil yang baik. Dengan demikian dapat dibandingkan ada atau tidaknya perbedaan efek proteksi ginjal dari minyak kelapa sawit yang berasal dari buah dengan yang berasal dari daun dan digunakan dua dosis dari hasil konversi pada tikus 100 mg/kgBB dan

150 mg/kgBB untuk optimasi dosis terapi (Tan *et al.*, 2011) . Kelompok KP yang telah diinduksi NTA tidak diberi perlakuan apapun. Perlakuan dilakukan selama 14 hari.

#### 4.7.9.2. Pembedahan

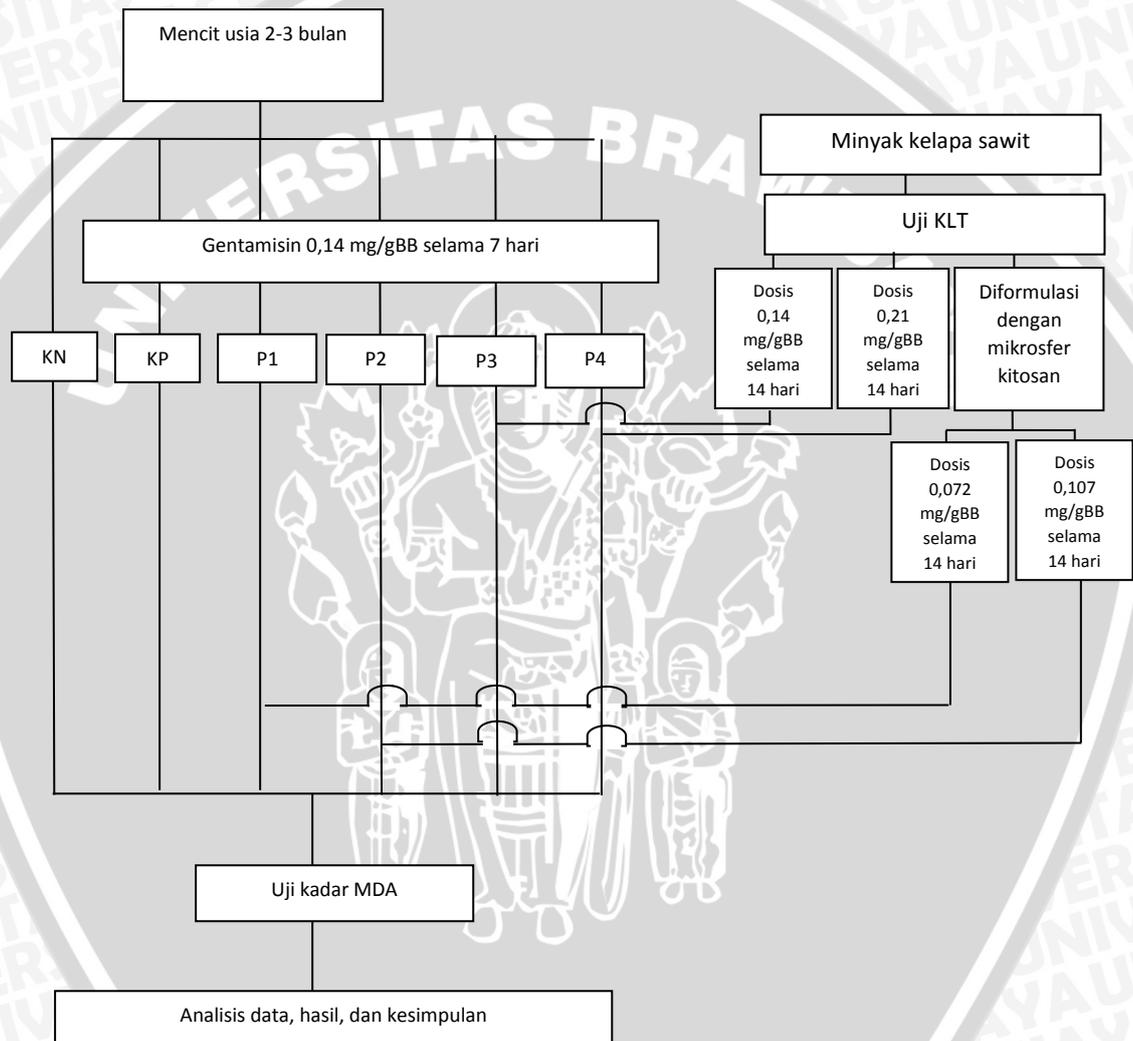
Berdasarkan prosedur tetap pembedahan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, sebelum pembedahan *Mus musculus* diinjeksi ketamin 0,1 mL ketamin (100 mg/mL) secara i.m. kemudian setelah *Mus musculus* sudah kehilangan kesadarannya, dilakukan pembedahan di papan bedah dengan menyayat bagian ventral *Mus musculus* dan dilakukan pengambilan organ ginjal. Sampel ginjal diletakkan dalam pot organ. Selanjutnya *Mus musculus* dikuburkan secara langsung di dalam tanah dengan kedalaman 70 cm dan dengan diameter 50 cm.

#### 4.7.9.3. Uji Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) menggunakan spektrofotometer karena lebih sederhana, cukup sensitif, dan juga sering dilakukan untuk pengukuran MDA sampai pada saat ini. Selain itu metode ini lebih cepat dan murah jika dibandingkan dengan HPLC (Zeb dan Fareed, 2016). Ginjal dari masing-masing sampel ditimbang dengan berat rata-rata 100 mg. Kemudian sampel digerus di mortir sampai halus. Selanjutnya sampel diberi dapar fosfat sebanyak 1 mL dengan pH 7,4 untuk menjaga pH dan dimasukkan ke tabung mikro. Kemudian sampel ditambah dengan TCA 200  $\mu$ L, 200  $\mu$ L HCL 1 N untuk menetralkan pH, kemudian ditambahkan Na-Thio 200  $\mu$ L sebagai reagen yang bereaksi dengan MDA, dan terakhir ditambahkan akuades secukupnya untuk mencegah sampel mengering ketika proses pemanasan. Selanjutnya sampel dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 105°C selama 30 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan rpm 3500 selama 10 menit dalam suhu ruang. Selanjutnya

diambil supernatannya dan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan lamda 532 nm (SOP Laboratorium Farmakologi, 2016).

#### 4.7.9.4. Skema Penelitian



#### 4.10. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan uji hipotesis menggunakan *One-way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak kelapa sawit terhadap kadar MDA apabila persebaran data yang normal dan variasi homogen. Jika persebaran data tidak normal dan variasi tidak homogen maka dilakukan

*transform* logaritma dan apabila data masih belum berhasil memiliki distribusi yang normal dan variasi yang homogen maka dapat digunakan analisis statistik nonparametrik dengan uji Kruskal-Wallis.

