

III. MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 26 Januari sampai 26 Februari tahun 2024 bertempat di Laboratorium Farmasi FKH UWKS dan pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium FIKES Universitas Muhamaddiyah Kota Sidoarjo.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang akan digunakan dalam uji ini diantaranya Microlab 300 Nurralab Indonesia, kandang tikus, tempat pakan dan minum tikus, alat tulis, *glove*, masker, tabung mikrohematokrit, tabung EDTA, *spuid* 1cc, *spuid* 3cc, kalkulator, *coolbox*, *dry ice*, lap kain, mortar, stamper, timbangan, tabung 15ml, tabung 10ml, sendok, jas lab, sonde oral tikus.

3.2.2 Bahan Penelitian

Penelitian ini akan menggunakan bahan diantaranya tikus putih jantan umur 6 bulan galur *Sprague dawley* dengan berat 250-300gram, pakan RatBio, sekam kayu, sampel darah tikus, *paracetamol* 500mg, tissue, CmCna, aquades, kertas perkamen, air minum, *atropine sulfat*, *acepromazine*, *ketamin*.

3.2.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah tikus putih *Sprague dawley* berjenis kelamin jantan, dengan umur 6 bulan dan memiliki berat badan 250 – 300 gram. Sebelum diberikan perlakuan tikus menjalani masa adaptasi selama 7 hari.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan pada uji ini adalah eksperimental laboratorik yang menggunakan tikus *Sprague dawley* untuk diambil sampel darahnya. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 perlakuan dan 6 ulangan. Rata-rata perhitungan ulangan menggunakan rumus Federer yaitu :

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

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan

dengan $t = 3$, maka didapat :

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 12$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6 \times 3 = 18$$

Berdasarkan hasil perhitungan di atas didapatkan jumlah ulangan rumus Federer adalah 6 ekor dalam setiap kelompok. Jadi pada penelitian ini dibutuhkan 18 ekor tikus *Sprague dawley*.

3.3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dikelompokkan menjadi tiga macam yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kendali. Variabel bebas yaitu dosis

paracetamol. Variabel terkontrol yaitu umur, berat tikus dan jenis kelamin tikus. Variabel terikat yaitu kadar BUN dan kreatinin.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini akan dilakukan dengan teknik pengambilan sampel secara *post test* atau setelah hewan coba diberikan perlakuan. Sampel pengambilan darah tikus *Sprague dawley* pada hari ke 11.

3.5 Prosedur Pembuatan Sampel

3.5.1 Pembuatan Larutan Paracetamol

Paracetamol tablet 500 mg dengan dosis 250 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB ditambahkan dengan CaCl_2 0,1% dicampurkan dan digerus dengan stamper dan mortar sampai homogen dan halus lalu dicampurkan dengan aquades *ad* 1ml tiap ekor untuk diberikan pada tikus secara oral menggunakan sonde tikus.

3.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Tikus *Sprague dawley* sebanyak 18 ekor, dengan tiga perlakuan dan enam ulangan. Tikus dipilih secara acak dimana dalam satu kandang terdapat enam ekor tikus *Sprague dawley* dengan ukuran kandang 30cm x 30cm x 25cm yang diberikan alas sekam kayu setebal 3-5 cm. Tikus *Sprague dawley* yang digunakan pada penelitian ini harus mempunyai keadaan yang sehat dengan ciri-ciri memiliki rambut yang mengkilat, mata jernih, juga hidung dan telinga yang bersih. Tikus diadaptasikan selama tujuh hari dengan tujuan membantu hewan coba beradaptasi dengan lingkungan baru, mengurangi stres, dan memastikan hewan coba dalam kondisi yang sehat dan layak untuk dilakukan pengujian.

Perlakuan dilakukan selama 10 hari. Tikus *Sprague dawley* diberi pakan *Rat Bio* sebanyak 20 – 30 gram sebanyak dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari dan pemberian minum secara *ad libitum*.

Perlakuan yang dilakukan pada tikus diberikan label P0, P1, dan P2 dengan keterangan P0 adalah sebagai kelompok kontrol tikus yang hanya diberikan aquades secara oral. P1 adalah kelompok tikus yang diberikan *paracetamol* dengan dosis 250 mg/kg BB secara oral. P2 adalah kelompok tikus yang diberikan *paracetamol* dengan dosis 400 mg/kg BB secara oral. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal menggunakan sonde oral yang dimasukkan ke dalam mulut tikus dan dikucurkan ke dalam langit - langit mulut arah belakang sampai ke esophagus kemudian langsung masuk ke dalam lambung.

3.5.3 Proses Pengambilan Darah

Proses pengambilan sampel darah dilakukan dengan *handling* dan *restrain* juga penghitungan dosis pre anestesi dan anestesi yang benar. Tikus diberikan pre anestesi dan anestesi sebelum dilakukan pengambilan sampel darah lalu diinjeksikan secara *intra peritoneal*. Pengambilan sampel darah seluruh tikus dilakukan pada hari ke 11 melalui vena orbitalis di mata menggunakan tabung hematokrit sebanyak 0,3-0,5 cc. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan dikumpulkan ke dalam *coolbox* yang berisi *dry ice*. Sampel kemudian diserahkan ke laboran untuk dilakukan pengujian kadar BUN dan kreatinin di Laboratorium FIKES Universitas Muhamaddiyah Sidoarjo.

3.5.4 Pengujian Kadar BUN

Ureum adalah senyawa non protein nitrogen (NPN) dengan konsentrasi tinggi yang ada pada darah. Urea dihasilkan sebagai produk akhir metabolisme protein dan dieksresikan melalui ginjal. Pemeriksaan urea dalam serum disebut juga pemeriksaan kadar urea dalam darah (*blood urea nitrogen*) yang biasa disingkat BUN. Pemeriksaan BUN menjadi indikasi kondisi dehidrasi, gagal pra-renal, atau bahkan gagal ginjal. Pemeriksaan BUN dilakukan secara *kolorimetrik enzimatik* menggunakan enzim urease yang menghidrolisis urea dalam darah menjadi ion amonium (NH_4^+). Reaksi berlanjut karena adanya enzim glutamat dehidrogenase (GLDH), sehingga NADH dengan adanya ion amonium akan menjadi NAD^+ . Pengukuran dilakukan berdasarkan pengurangan NADH pada panjang gelombang 340 nm (Nugraha dan Badrawi, 2018).

Prinsip kerja metode enzimatik urease adalah urea dihidrolisis dengan adanya H_2O dan urease membentuk amonium dan karbondioksida. Ion amonium yang terbentuk karena oksoglutarat, NADH dan hidrogen akan dikatalisis membentuk glutamat, NAD^+ dan H_2O . Konsentrasi urea sebanding dengan perubahan absorbansi pada 340 nm. Spesimen darah yang dilakukan untuk pengujian harus terhindar dari fluorida atau amonium sebagai antikoagulan yang dapat mengganggu hasil pengujian. Urea dapat stabil selama 24 jam pada suhu 20°C - 25°C (Nugraha dan Badrawi, 2018).

Pengujian dilakukan menggunakan alat microlab 300 yang memiliki lima prinsip kerja yaitu *spektrofotometri*, *turbidimetri*, *fluoresensi polarimetri*, *ion selektive elektrode potentiometri*, dan *elektro chemiluminescence*. Pemeriksaan

dilakukan dengan cara menyambungkan terlebih dahulu alat microlab 300 dengan arus listrik, nyalakan tombol on pada CPU dan tekan tombol on pada mesin microlab 300, setelah muncul start up pada layar tunggu sekitar 15 menit. Pilihlah menu *measure* pada alat microlab 300 untuk melakukan pemeriksaan kimia darah lalu pertama buat blanko reagen dengan mencampurkan reagen 1 sebanyak 1000 μ L, dengan reagen 2 sebanyak 250 μ L menggunakan mikropipet ke dalam tabung serologi, homogenkan menggunakan vortex, lalu lakukan pembacaan pada alat microlab 300 dengan gelombang 340nm dan didapatkan hasil A1. Kedua, campurkan pada tabung serologi reagen 1 sebanyak 1000 μ L, reagen standard 10 μ L, dan reagen 2 250 μ L, homogenkan dan lakukan pembacaan pada alat microlab 300 pada gelombang 340nm dan didapatkan hasil A2 standard. Ketiga, campurkan pada tabung serologi reagen 1 sebanyak 1000 μ L, sampel serum darah sebanyak 10 μ L, dan reagen 2 sebanyak 250 μ L, homogenkan dan lakukan pembacaan pada alat microlab dengan gelombang 340nm dan didapatkan hasil A2 pemeriksaan. Lakukan dengan dua kali pengukuran yaitu pengukuran pertama pada 30 detik dan pengukuran kedua pada 90 detik. Setelah semua pengukuran telah dilakukan, pilih menu *evaluated test* untuk melihat keseluruhan data hasil pemeriksaan pada parameter yang sama yg sudah dilakukan sebelumnya pada layar mesin microlab 300. Terakhir dilakukan penghitungan ke dalam rumus untuk mendapatkan hasil akhir kadar BUN (Dai, dkk., 2020). Kadar BUN normal pada tikus sebesar 12 - 20 mg/dl.

Ureum (mg/dL)

$$\text{Hasil} = \frac{\text{Abs (A2 - A1) Pemeriksaan}}{\text{Abs (A2 - A1) Standar}} \times \text{Konsentrasi standar}$$

3.5.5 Pengujian Kadar Kreatinin

Kreatinin merupakan produk sampingan katabolisme dalam otot dari kreatin fosfat. Jumlah kreatin yang diproduksi tubuh sebanding dengan masa otot. Karena itu umur dan jenis kelamin dapat mempengaruhi kadar kreatinin. Pengukuran kadar kreatinin dalam darah sering digunakan untuk mengetahui fungsi, tingkat kerusakan, atau memantau penyakit ginjal. Kadar kreatinin dianggap lebih sensitif untuk mengetahui fungsi ginjal dibandingkan BUN. Kadar BUN dan kreatinin sering menjadi indikator utama dalam mengetahui fungsi ginjal, jika kadar BUN meningkat sedangkan kreatinin normal kemungkinan hanya terjadi hipovolemia, namun apabila keduanya mengalami peningkatan maka perlu dicurigai terjadinya gangguan ginjal (Nugraha dan Badrawi, 2018).

Pengukuran kadar kreatinin yang paling sering digunakan berdasarkan pada reaksi Jaffe. Reaksi ini melibatkan asam pikrat, sehingga keberadaan kreatinin dalam serum akan membentuk warna jingga kemerahan yang diukur pada panjang gelombang 492nm. Prinsip kerja metode ini adalah kreatinin bereaksi dengan larutan pikrat alkalis membentuk kompleks warna jingga kemerahan yang diukur pada panjang gelombang 492nm (Nugraha dan Badrawi, 2018).

Pengujian dilakukan menggunakan alat microlab 300 yang memiliki lima prinsip kerja yaitu *spektrofotometri*, *turbidimetri*, *fluoresensi polarimetri*, *ion selektive elektrode potentiometri*, dan elektro *chemiluminescence*. Pemeriksaan dilakukan dengan cara menyambungkan terlebih dahulu alat microlab 300 dengan arus listrik, nyalakan tombol on pada CPU dan tekan tombol on pada mesin microlab 300, setelah muncul start up pada layar tunggu sekitar 15 menit. Pilihlah

menu measure pada alat microlab 300 untuk melakukan pemeriksaan kimia darah. Pengujian dilakukan dengan cara pertama, buat blanko reagen dengan mencampurkan reagen 1 sebanyak 1000 μL , dengan reagen 2 sebanyak 250 menggunakan mikropipet ke dalam tabung serologi, homogenkan menggunakan vortex, lalu lakukan pembacaan pada alat microlab 300 dengan gelombang 492nm dan didapatkan hasil A1. Kedua, campurkan pada tabung serologi reagen 1 sebanyak 1000 μL , reagen standard 10 μL , dan reagen 2 250 μL , homogenkan dan lakukan pembacaan pada alat microlab 300 pada gelombang 492nm dan didapatkan hasil A2 standard. Ketiga, campurkan pada tabung serologi reagen 1 sebanyak 1000 μL , sampel serum darah sebanyak 10 μL , dan reagen 2 sebanyak 250 μL , homogenkan dan lakukan pembacaan pada alat microlab 300 dengan gelombang 492nm dan didapatkan hasil A2 pemeriksaan. Lakukan tiga kali pengukuran yaitu pengukuran pertama pada 0 detik, pengukuran kedua pada detik ke 60 dan ketiga pada detik ke 120. Setelah semua pengukuran telah dilakukan, pilih menu evaluated test untuk melihat keseluruhan data hasil pemeriksaan pada parameter yang sama yg sudah dilakukan sebelumnya pada layar mesin microlab 300. Terakhir dilakukan penghitungan ke dalam rumus untuk mendapatkan hasil akhir kadar kreatinin (Dai, dkk., 2020). Kadar kreatinin normal sebesar 0,3 – 1,0 mg/dl.

Kreatinin (mg/dL)

$$\text{Hasil} = \frac{\text{Abs (A2 - A1) Pemeriksaan}}{\text{Abs (A2 - A1) Standar}} \times \text{Konsentrasi standar}$$

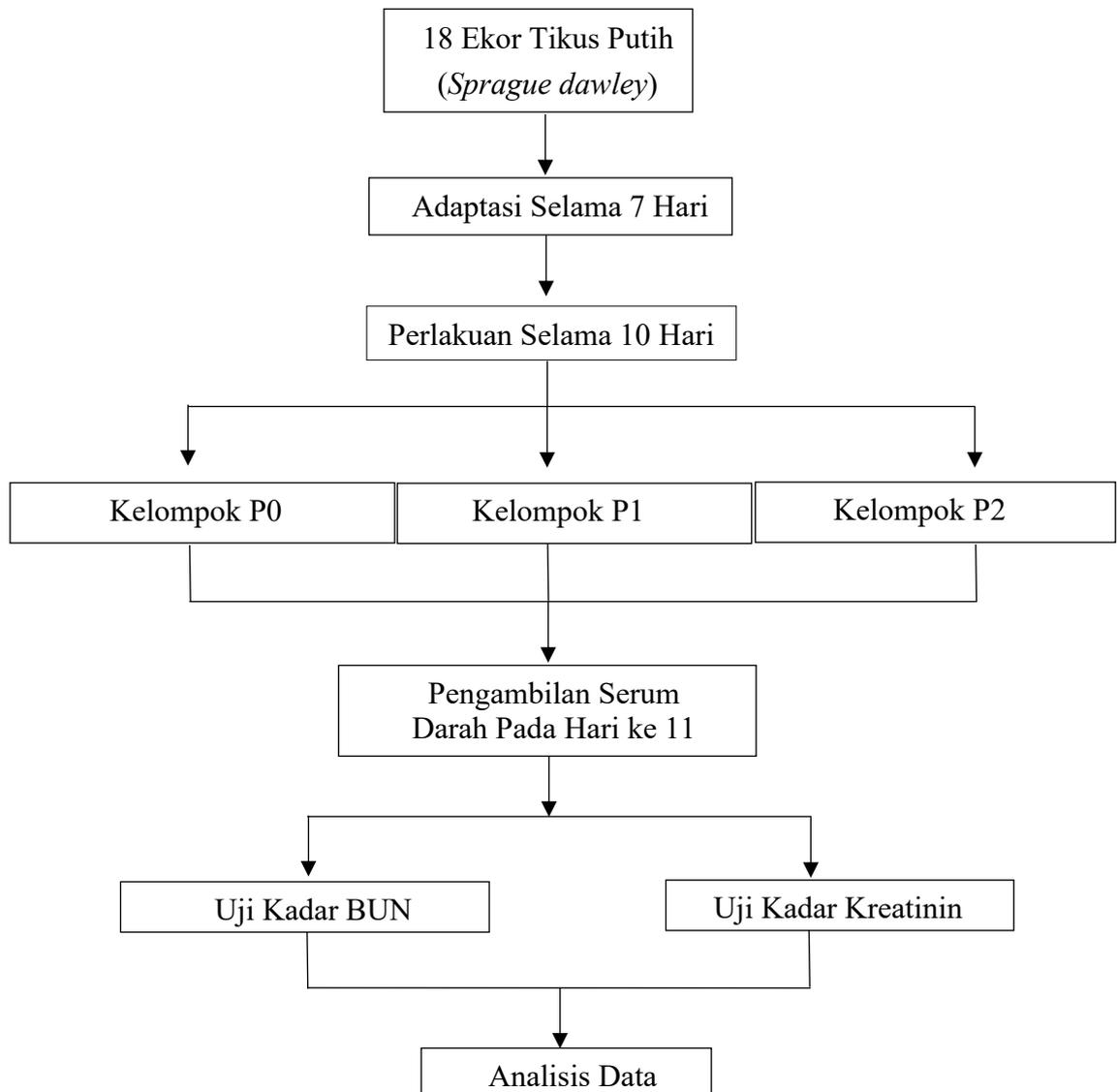
3.6 Terminasi Hewan Coba

Euthanasia pada hewan coba dilakukan dengan cara dislokasi cervikalis pada setiap hewan coba, yaitu dengan menahan dan menekan secara kuat bagian leher tikus menggunakan benda tumpul lalu menarik dengan kencang dan cepat bagian ekor tikus. Tikus yang sudah mati kemudian dimusnahkan menggunakan insenerator.

3.7 Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pemeriksaan kadar BUN dan kreatinin dianalisis menggunakan uji Anova pada tingkat kepercayaan 95% kemudian data dianalisis menggunakan software SPSS 16 dan dilanjutkan dengan Uji *Duncan*.

3.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.6 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan:

P0 kelompok tikus yang diberikan aquades secara oral

P1 kelompok tikus yang diberikan *paracetamol* secara oral dosis 250 mg/kg BB

P2 kelompok tikus yang diberikan *paracetamol* secara oral dosis 400 mg/kg BB.