

BAB III

SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek Penelitian

3.1.1 Subjek

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur webster, dengan berat antara 20-30 gram dan usia mencit sekitar 2-3 bulan yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung.

3.1.2 Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini penentuan jumlah sampel diambil berdasarkan rumus Frederer :

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

t = kelompok perlakuan

n = jumlah sampel

Berdasarkan rumus diatas, dengan jumlah kelompok perlakuan 5 didapatkan jumlah sampel pada percobaan ini:

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

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 5$$

Besar sampel :

Besar sampel pada percobaan ini adalah 25 ekor mencit, yang di dapat dari rumus yang di uraikan di atas.

Untuk mengantisipasi terjadinya kematian atau drop out pada saat percobaan, maka dilakukan penambahan sampel sebanyak 20%, sehingga jumlah sampel tiap kelompok menjadi 6 ekor mencit dengan total sampel 30 ekor mencit.

3.1.3 Kriteria Inklusi

- a. Mencit dengan berat badan 20 – 30 gram dan berjenis kelamin jantan
- b. Usia mencit 2-3 bulan
- c. Mencit dalam keadaan sehat

3.1.4 Kriteria Eksklusi

- a. Tidak terjadi respon hiperurisemia pada mencit yang telah diinduksi
- b. Mencit yang mati sebelum dilakukan pemeriksaan
- c. Mencit yang sakit selama penelitian

3.2 Metode penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik dari analisis data menggunakan ANOVA dan DUNCAN.

3.2.2 Variabel Penelitian

3.2.2.1 Variabel terikat : Hiperurisemia

3.2.2.2 Variabel bebas : Konsentrasi air perasan buah jeruk nipis

(*Citrus aurantifolia*)

3.2.3 Proses

3.2.3.1 Alat

Alat penelitian terdiri dari :

- a. Sonde oral
- b. Spuit 1 cc
- c. Kandang mencit
- d. Tempat makan mencit
- e. Sekam
- f. Kapas
- g. Tissue
- h. Lap
- i. Sarung tangan
- j. Alat pengukur kadar asam urat (*microlab*)
- k. Mikropipet
- l. Tip biruml
- m. Tip kuning
- n. *Ependorf*
- o. *Sentrifuse*



Gambar 3.1 Alat Pengukur Kadar Asam Urat (*microlab*)³⁴.
(Diunduh dari : Info alat kesehatan “e-alatkesehatan.com”)



Gambar 3.2 Alat Sentrifugasi³⁴.
(Diunduh dari : Info alat kesehatan “e-alatkesehatan.com”)

3.2.3.2 Bahan

Bahan penelitian terdiri dari :

- a. Air perasan buah jeruk nipis (*citrus aurantifolia*)
- b. Allopurinol
- c. Hati ayam (sebagai induksi untuk hiperurisemia)
- d. Kalium oksonat (sebagai induksi untuk hiperurisemia)
- e. NaCl
- f. Ethanol
- g. Reagen Asam Urat
- h. Aquades
- i. Na CMC

3.2.4 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi operasional	Alat ukur	Satuan	Skala
1.	Hiperurisemia	Hiperurisemia adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar asam urat darah di atas normal. Mencit dikatakan hiperurisemia jika kadar asam urat darahnya berkisar antara 1,7-3,0 mg/ dL ^{1,2,3,35} .	Alat pengukur Kadar asam urat	mg/dl	Rasio
2.	Konsentrasi air perasan jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Sediaan cair yang di buat dari hasil perasan buah jeruk nipis	Perbandingan	Presentase	Interval

3.2.5 Prosedur Penelitian

a. Pembuatan Jus Hati Ayam 50 % ^{b/v}

Hati ayam adalah salah satu jenis makanan yang tinggi protein yang dapat mengakibatkan peningkatan kadar asam urat di dalam darah, jus hati ayam pada penelitian kali ini di gunakan sebagai induksi hiperurisemia eksogen. Konsentrasi jus hati ayam dibuat dengan perbandingan 50% ^{b/v} dengan cara mencampurkan 50 gram hati ayam, kemudian ditambahkan air hingga volumenya 100 ml²⁰.

b. Pembuatan Na CMC 0,5%.

Na CMC di gunakan sebagai suspensi alami untuk melarutkan allopurinol yang akan di berikan pada kelompok mencit standar pada penelitian. Dibuat suspensi Na CMC 0,5 % dengan penimbangan Na CMC 500 mg, kemudian dilakukan pengembangan dengan menambahkan air suling panas sedikit demi sedikit ke dalam mortir sambil digerus sampai volume mencapai 100 ml²¹.

c. Pembuatan Larutan Kalium Oksonat 250 mg/kg BB

Kalium oksonat adalah suatu sediaan serbuk yang biasa di gunakan sebagai induksi hiperurisemia endogen pada penelitian dengan menggunakan hewan coba mencit. Pada penelitian kali ini induksi hiperurisemia pada mencit secara endogen dilakukan dengan cara membuat larutan kalium oksonat 5 mg/0,5 ml dengan cara menimbang 250 mg kalium oksonat kemudian dilarutkan dalam NaCl 0,9% hingga volumenya 25 ml^{36,37}.

a. Pembuatan Suspensi Allopurinol 10 mg/kg BB

Allopurinol sukar larut dalam ethanol dan air, sehingga sediaan oral allopurinol dalam penelitian ini di buat dalam bentuk suspensi dengan cara mencampurkan allopurinol dengan Na CMC³⁸. Dibuat konsentrasi 0,18 mg/0,5 ml dengan cara menimbang 72 mg serbuk Allopurinol kemudian disuspensikan ke dalam larutan Na CMC 0,5% sampai volume mencapai 200 ml^{21,38}.

b. Pembuatan Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Perhitungan dosis didapat dari penelitian sebelumnya (Muhammad Febryanto), di dapat dosis pada manusia adalah 250 ml yang di konversi dari manusia ke mencit dengan menggunakan rumus tabel konversi Laurence-Bacharach pada mencit dengan berat 20 gram adalah :

$$250 \times 0.0026 = 0.65 \text{ ml/20g BB mencit}$$

$$\text{Dosis 1 : } 0.65/2 = 0.325 \text{ ml/20g BB mencit}$$

$$\text{Dosis 2 : } 0,65 \text{ ml/20g BB mencit}$$

Dosis 3 : 1,3 ml/20g BB mencit

c. Pengujian Aktivitas Antihiperurisemia dengan Pemanding Allopurinol

Sebelum dilakukan percobaan, hewan diadaptasikan selama 7 hari, kemudian hewan dikelompokkan menjadi 5 kelompok. Semua mencit dari masing-masing kelompok dipuasakan selama 4 jam dan diambil darahnya untuk melihat kadar darah normal. Setelah didapat data kadar darah normal, semua mencit diinduksi jus hati ayam 50% diberikan dua kali sehari (0,3 ml/20g BB) selama 7 hari secara peroral. Pada hari ke 13 semua mencit diinduksi dengan Kalium Oksonat 250 mg/kg BB secara intraperitoneal, 1 jam kemudian mencit diambil darahnya untuk melihat kenaikan kadar asam urat di dalam darah. Setelah itu mencit diberi perlakuan sesuai dengan aturan kelompoknya selama 7 hari, yaitu:

1. Kelompok kontrol : diberi Na CMC 0,5%
2. Kelompok pemanding : diberi Allopurinol 10 mg/kg BB
3. Kelompok dosis 1 : diberi air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan dosis 0.325 ml/20g BB mencit
4. Kelompok dosis 2 : diberi air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan dosis 0.65 ml/20g BB mencit
5. Kelompok dosis 3 : diberi air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan dosis 1.3 ml/20g BB mencit

Pada hari ke 19 semua mencit yang telah di beri perlakuan sesuai dengan kelompoknya diambil darahnya untuk melihat kadar penurunan asam urat di dalam darah dan dilihat kelompok perlakuan yang mana yang memiliki efek penurunan kadar asam urat yang paling tinggi.

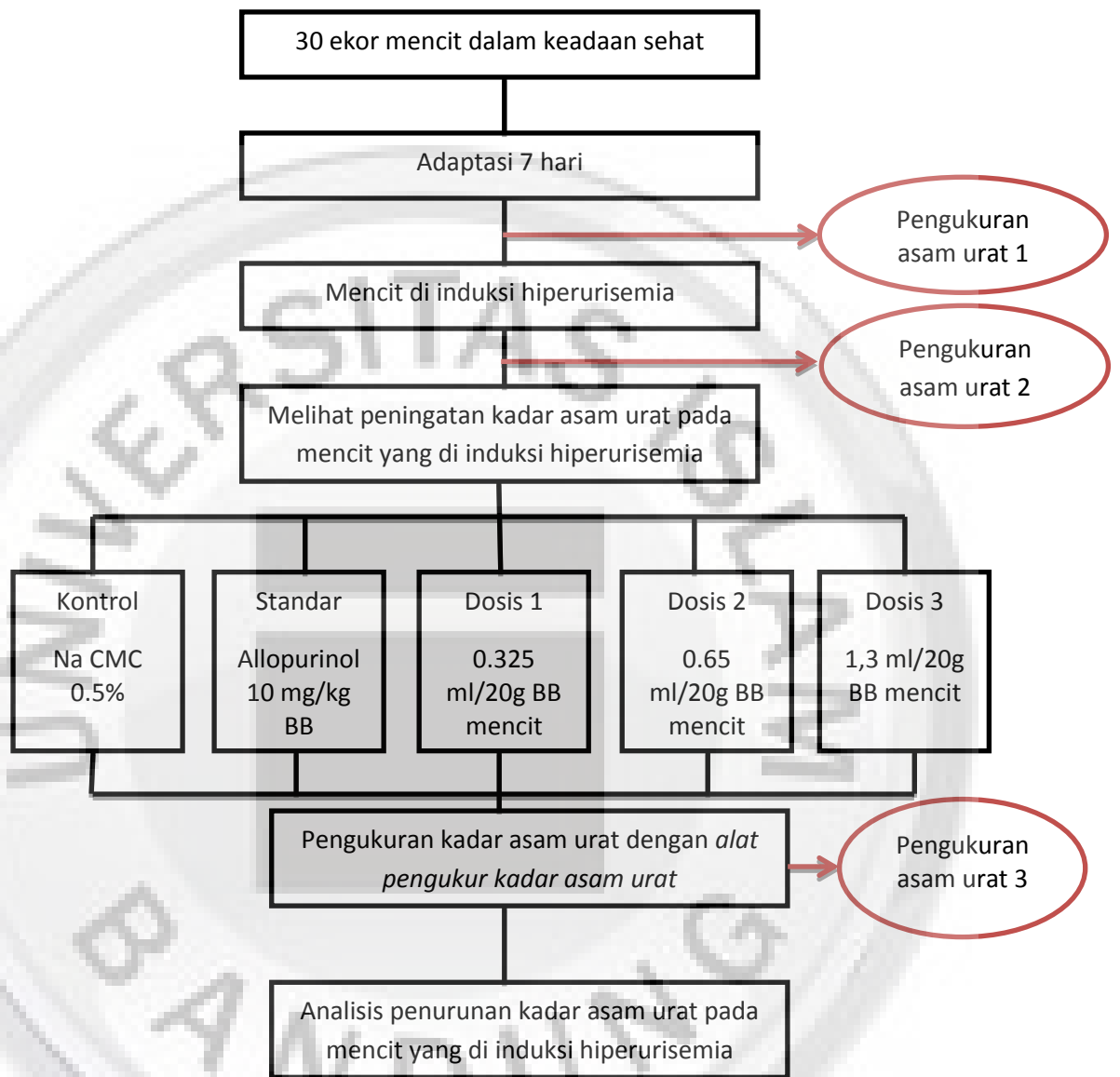
g. Pengukuran Asam Urat

Penetapan kadar asam urat dalam serum darah dilakukan dengan metode enzimatis PAP uricase. Sebanyak 10 μ L serum dicampurkan dengan 0,5 ml kit pereaksi asam urat, diinkubasi selama 10 menit, lalu diukur kadar asam urat dengan Microlab 300 pada panjang gelombang 546 nm.

h. Setelah penelitian

Dilakukan perawatan dan pemulihan pada seluruh mencit yang telah mendapatkan perlakuan dengan memberikan obat antihiperurisemia.

3.2.6 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Bagan alur Penelitian

3.2.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan uji ANAVA dan DUNCAN.

3.2.8 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat

Pembuatan air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi dan Terapi Universitas Padjajaran Eyckman.

b. Waktu

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan 25 Maret sampai 14 April 2015

3.2.9 Aspek Etik Penelitian¹⁹.

Penelitian ini berpatokan kepada etika penelitian yang di kemukakan oleh Russel (1959) yang mencangkup aspek etik 3R, yaitu:

a. *Replacement* / menggantikan hewan coba dengan alternatif lain

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 mahluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian, yaitu: relatif (mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah) dan absolut (mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer).

b. *Reduction* diartikan sebagai pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) > 15$, dengan n adalah

jumlah hewan yang diperlukan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan. Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya. Untuk mengatasinya, diperlukan penggunaan desain statistik yang tepat agar didapatkan hasil penelitian yang sah.

- c. *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (humane), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian.