

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2012 sampai bulan Mei 2012.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah hewan model tikus strain Wistar jantan usia 6-7 minggu yang diinduksi oleh CCL_4 (*carbon tetrachloride*) dan perlakuan. Tikus Wistar jantan dipilih sebagai hewan coba karena terbukti dari penelitian sebelumnya tikus tersebut dapat terinduksi penyakit sirosis hepar dengan cepat. Pemilihan usia 6-7 minggu dikarenakan pada usia tersebut masih belum terdapat pengaruh dari hormon-hormon pertumbuhan dan seksual yang dapat menjadi faktor perancu (*confounding*) selama penelitian.

Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian ekspremental untuk mencegah terjadinya

bias. Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi:

1. Tikus strain Wistar jantan
2. Tikus berwarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.
3. Umur 6-7 minggu
4. Berat rata-rata 150 gram

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan sehingga tikus Wistar jantan dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok berdasarkan jenis pemberian diet dan bahan vaksin yang diberikan. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	tidak diberikan perlakuan apapun
Kontrol Positif	Induksi CCL ₄ tanpa diberikan ekstrak <i>oatss</i>
Kelompok A	Induksi CCL ₄ + ekstrak <i>oats</i> 30 mg/kgBB
Kelompok B	Induksi CCL ₄ + ekstrak <i>oats</i> 60 mg/kgBB
Kelompok C	Induksi CCL ₄ + ekstrak <i>oats</i> 90 mg/kgBB

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Tikus Kontrol dan Perlakuan

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan Perlakuan

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan

besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

$$n(p-1) = 15 \quad (p : \text{jumlah perlakuan}, n : \text{jumlah ulangan}), p = 5 \text{ sehingga :}$$

$$n(5-1) = 15 \rightarrow 4n = 15 \rightarrow n = 3,75.$$

Dibulatkan ke atas menjadi 4 pengulangan

sehingga jumlah tikus Wistar jantan yang digunakan sebanyak 20 ekor

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel Bebas dalam penelitian ini adalah pemberian CCL_4 dan ekstrak oats. Dimana dibagi menjadi beberapa kelompok: Kontrol Negatif (tanpa perlakuan), Kontrol Positif (Induksi CCL_4), P1 (Induksi CCL_4 + Ekstrak 90mg/KgBB), P2 (Induksi CCL_4 + Ekstrak 180mg/kgBB), dan P3 (Induksi CCl_4 + Ekstrak 360mg/kgBB).

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat terdiri dari gambaran histoPA jaringan hepar, kadar SGOT, SGPT, Protein total, dan bilirubin serum.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Perawatan Tikus sebagai Hewan Coba

Tikus Wistar jantan dibeli dari peternakan tikus di Malang dan dirawat di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Setelah tikus datang di laboratorium, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Diet yang digunakan adalah pakan ternak susu-PAP.

Alat : kandang tikus, tempat minum, timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan

Bahan : susu-PAP, terigu, air, dan sekam

4.6.2 Penginduksian Kerusakan Hepar pada Hewan Coba

Penginduksian kerusakan hepar pada tikus dilakukan seperti metode standar yang telah dilakukan oleh Gao *et al.* (2009). CCL₄ digunakan sebagai agen yang dapat menginduksi terjadinya kerusakan hepar pada hewan coba. CCL₄ diberikan secara per oral sebanyak 1 ml/kg BB yang dicampurkan dengan minyak jagung dengan perbandingan 1:1 (v/v) sebanyak dua kali tiap minggunya selama delapan minggu (Gao *et al.*, 2008).

Alat : spuit insulin, kassa, alkohol

Bahan : CCL₄, minyak jagung

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Oats

Oats yang didapatkan dicuci sampai bersih. Kemudian dipotong kecil-kecil dan dioven dengan suhu 80^o atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air). Setelah itu, oats ditimbang sebanyak 100 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Lalu, ditambahkan ethanol sampai volume 900 mL dan dikocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit). Kemudian, larutan dibiarkan 1 malam sampai benar-benar mengendap.

Proses selanjutnya adalah proses evaporasi. Larutan yang sudah mengendap diambil lapisan atasnya yang kemudian dimasukkan ke dalam labu evaporator 1 liter. Labu evaporator itu kemudian dipasangkan pada evaporator. Kemudian, water bath diisi sampai penuh. Semua rangkaian alat termasuk rotary

evaporator, pemanas water bath (diatur sampai 90⁰) dipasang kemudian disambungkan dengan aliran listrik. Larutan ethanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada di dalam labu. Setelah itu, proses ditunggu sampai aliran methanol berhenti menetes pada labu penampung. Hasil yang diperoleh kira-kira setengah dari bahan yang digunakan. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol kemudian disimpan di dalam freezer.

Alat : oven, gelas erlenmeyer, kertas saring, timbangan, corong gelas, labu evaporator, pendingin sipral/rotary evaporator, labu penampung etanol, evaporator, setal water pump, water pump, water bath, vacuum pump

Bahan : oatss, ethanol, akuades, botol hasil ekstrak

4.6.4 Pemberian Ekstrak Oats

Ekstrak *oats* diberikan setelah tikus diberikan CCL₄ selama dua minggu. Hal tersebut bertujuan untuk menginduksi kerusakan hepar terlebih dahulu. Pemberian ekstrak *oats* ini bertujuan untuk menginduksi mekanisme perbaikan hepar yang telah mengalami kerusakan terlebih dahulu (Fu *et al.*, 2008). Ekstrak *oats* diberikan setiap hari dan diberikan sampai hari minggu ke-8 yaitu pada hari pembedahan. Ekstrak *oats* yang diberikan dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu: kelompok A dengan dosis 30 mg/kgBB, kelompok B dengan dosis 60 mg/kgBB, dan kelompok C dengan dosis 90 mg/kgBB.

Alat : sonde makan tikus

Bahan : ekstrak *oats*

4.6.5 Pembedahan Tikus

Pembedahan dilakukan pada minggu ke-8. Hal tersebut didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya di mana induksi CCL₄ selama delapan minggu sudah dapat menginduksi terjadinya kerusakan hepar yang kronis pada tikus hewan coba (Fu *et al*, 2008; Gao *et al.*, 2009). Tikus dibunuh menggunakan anastesi klorofoam kemudian organ heparnya diambil dan diawetkan menggunakan formalin 10%. Setelah itu, darahnya diambil untuk dilakukan pengecekan tes fungsi faal hepar.

Alat : gunting bedah, pinset, jarum pentul, stereofom, kapas

Bahan : klorofoam, formalin 10%, alkohol, botol film, spuit insulin, vacutainer

4.6.6 Pembuatan Preparat HistoPA Jaringan Hepar Tikus

Pembuatan preparat HistoPA hepar tikus bertujuan untuk membandingkan struktur anatomis hepar tikus setelah diberikan ekstrak oatss dibandingkan yang tidak diberikan ekstrak. Preparat jaringan hepar tikus dibuat dengan metode blok paraffin dan dicat dengan *Hematoksin-Eosin* (HE). Slide dibuat dengan *Automatic Tissue Processing*. Penampang hepar dilihat pada mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dinilai kerusakan jaringannya (Permata, 2009).

Alat : incubator, object glass, cover glass, mikrotom, pinset, dan *Automatic Tissue Processing*

Bahan : formalin 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, parafin, alkohol 70%, dan *Hematoksin-E* 22 (HE)

4.6.7 Pengukuran Fungsi Fisiologis Hepar

Pengukuran kadar SGPT, SGOT, bilirubin, dan protein total bertujuan untuk menilai fungsi fisiologis hepar yang telah diberikan ekstrak *oatss*. Setelah dilakukan pembedahan, dilakukan pengambilan sampel darah dari jantung. Untuk mendapatkan serum darah, sampel darah yang diperoleh disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit. Kemudian serum dipisahkan ke dalam tabung ependorf. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap kadar enzim SGPT, SGOT, bilirubin total dengan menggunakan kit, serta pengukuran protein total dengan metode Biuret (Panjaitan *et al.*, 2007).

Alat : sentrifus, ependorf

Bahan : sampel darah tikus, *liver function test kit*

4.6.8 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diambil berupa data-data hasil pengamatan jaringan histoPA hepar tikus, kadar enzim SGPT, SGOT, kadar bilirubin, dan protein total. Data-data tersebut diambil setelah dilakukan pembedahan pada minggu ke-8. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc tukey* sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$. Uji statistik dicek dengan SPSS 16.