

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*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Biokimia dan Biomol, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) terhadap kadar TGF- β 1. Induksi CCL₄ mengacu pada dosis Sahreenet *al.*(2011) sebesar 0.5 ml/ kg, dua kali seminggu selama enam minggu. Dosis ekstrak mengacu pada penelitian Domitrovic *et al.*, (2009) dengan pemberian ekstrak luteolin 10, 25, dan 50 mg/kg BB didapatkan penurunan fibrogenesis yang signifikan. Maka digunakan variasi dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB selama lima minggu diawali pada minggu ke-2 penelitian.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Biokimia dan Biomol, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium FAAL Universitas Brawijaya Malang

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Jawa

Timur dan telah dilakukan determinasi . dan mencit galur BALB/c jantan berusia 6 minggu diperoleh dari UGM, Jogjakarta dengan berat 20-25 g

4.4 Penentuan jumlah sampel

Sampel penelitian adalah model mencit BALB/c jantan berusia 6-7 minggu sesuai penelitian Jong InYang dan rekannya (2009). Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

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

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dibesarkan menjadi 5 pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit kacang tanah yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan CCL₄ dan tanpa diberikan ekstrak kulit kacang tanah)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (mencit yang diberikan CCL₄ tanpa diberikan ekstrak kulit kacang tanah)
3. Kelompok 3: mencit yang diberikan CCL₄ dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi I (15mg/Kg BB)

4. Kelompok 4: mencit yang diberikan diberikan CCL_4 dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi II (30mg/Kg BB)
5. Kelompok 4: mencit yang diberikan diberikan CCL_4 dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi III (60 mg/Kg BB)

4.5.2 Variabel tergantung

- Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah: (a) Kadar TGF- β 1 ;(b) Masa relatif hepar

4.6 Definisi Operasional

- a. Kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur dan sebelumnya telah dilakukan determinasi.
- b. Hewan coba: mencit galur BALB/c jantan berusia 6 minggu karena galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia. Mencit diperoleh dari Universitas Gajahmada dengan berat 20-25 g
- c. CCL_4 (SIGMA) di dapat dari lab farmakologi. Merupakan zat yang terbukti mampu menginduksi fibrosis dan sirosis (Domitrović, 2009).
- d. Ekstark kulit kacang tanah adalah kadar atau konsentrasi dari kulit kacang tanah yang dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan ethanol 96%
- e. MMP-9 merupakan stimulator poten fibroblast yang mampu menginduksi hambatan regenerasi dan kerusakan jaringan hepar (Ogawa *et al.*, 2004).
- f. Pengukuran kadar TGF- β 1 menggunakan metode elisa

- g. Pengukuran masa relatif hepar digunakan untuk membandingkan berat hepar pada keadaan normal dengan hepar yang rusak dan dengan perlakuan pada dosis I dosis II dan dosis III

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Ekstraksi

4.7.1.1 Alat

1. kertas saring
2. gelas ekstraksi
3. neraca analitik
4. alat pemanas air
5. labu penampung hasil evaporator
6. *rotary evaporator*
7. tabung pendingin
8. alat pompa sirkulasi air dingin
9. bak penampung air dingin
10. pipa plastik
11. pompa vakum
12. tabung penampung etanol
13. batu didih
14. cawan penguap
15. oven

4.7.1.2 Bahan

1. kulit kacang tanah
2. etanol 96%
3. aquades

4.7.2 Uji TGF- β 1

4.7.2.1 Alat

1. mikrotiter
2. pipet
3. *Multichannel pipette*
4. *blue tip,*
5. *yellow tip*
6. *white tip*
7. vortex, *tube*
8. *sentrifuge*
9. *ELISA reader*
10. PBS
11. BSA 1%
12. Tween
13. Surblu TMB
14. antibodi MMP-9
15. Antibodi sekunder
16. coating buffer
17. HCL 1 N.
18. Tissue
19. Sarung tangan
20. Masker

4.7.2.2 Bahan

1. Serum darah
2. Jaringan hepar



4.7.3.2 Bahan

1. Jaringan hepar

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan pemeliharaan tikus, pembuatan diet normal, ekstraksi kulit kacang tanah, induksi CCL4, pembedahan

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol

Proses ekstraksi:

- Sampel serbuk kulit kacang tanah (100 g).
- Sampel tersebut dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Kemudian masukkan 300 ml etanol 96%
- Terus direndam selama 48 jam hingga mengendap.
- Rendaman disaring menggunakan kertas saring
- Ampas direndam lagi dengan pelarut etanol 70 % selama 24 jam
- Rendaman disaring kembali menggunakan kertas saring

Proses Evaporasi:

- Diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif daun ciplukan yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- Labu evaporasi dipasang pada evaporator.

- c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- d. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
- e. Larutan etanol 96% dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f. Ditunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu).
- g. Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik.
- h. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan masukkan dalam freezer.

4.8.2 Perawatan Mencit

Pemeliharaan hewan coba dilakukan dengan menyediakan mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alkohol 70%. Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama tujuh hari dan dibagi enam kelompok.

4.8.3 Pembuatan diet normal

Diet normal merupakan diet yang diberikan untuk kelompok A (kontrol negatif). Diet normal merupakan asupan normal tikus yang dibuat dengan mencampur bahan-bahan dengan komposisi PAR-S 25,6 gram, tepung terigu 14 gram, dan air 0,4 gram. Semua bahan dicampur di dalam baskom. Setelah itu, ditimbang dan dibulatkan dengan berat 40 gram

untuk satu tikus. Makanan diberikan 40 gram/tikus tiap harinya. Diet diberikan selama 60 hari. Sisa makanan hari sebelumnya juga ditimbang tiap harinya untuk mengetahui rerata asupan makanan setiap tikus

4.8.4 Induksi CCL₄

CCL₄ dilarutkan dalam minyak mineral saat akan digunakan. Mencit Balb/c dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan CCL₄ intraperitoneal dua kali seminggu selama enam minggu (Yang, 2009).

4.8.5 Pembedahan Mencit

Sebelum dibedah mencit dianestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh mencit yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil organ heparnya dan fiksasi ke dalam formalin 10%.

4.8.6 Pengukuran masa hepar

Setelah dilakukan pembedahan hepar mencit langsung dilakukan penimbangan tanpa dimasukan ke dalam formalin terlebih dahulu. Lalu dibandingkan berat hepar mencit normal, mencit dengan injeksi ccl₄ saja dan pada perlakuan dengan dosis yang berbeda

4.8.7 Pengukuran TGF- β 1 menggunakan *Immunostaining*

Pertama, deparafinisasi slide preparat hepar, lalu diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Kedua, slide diinkubasi pada suhu ruang lalu ditetesi aquades dan didiamkan 10 menit. Inkubasi blocking dengan penetes

100 μ L/slide dan didiamkan 60 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS 3x5 menit, blocking H₂O₂ 3% sebelum antibody primer, cuci lagi dengan PBS 3x5 menit. Lalu inkubasi antibody primer MMP-9 dan TGF- β 1 1:50 dalam PBS-FBS 10% dimana ditetesi 100 μ L larutan tiap slidanya dan langsung diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Ketiga, slide diinkubasi pada suhu ruang lalu dicuci PBS 3x5 menit. Inkubasi antibody sekunder MMP-9 dan TGF- β 1 1:100 dalam PBS yang didiamkan 2 jam pada suhu ruang. Cuci lagi dengan PBS 3x5 menit. Inkubasi SAHRP 1:200 dalam PBS, didiamkan 40 menit pada suhu ruang. Cuci lagi dengan PBS 3x5 menit. Cuci dengan aquades dan inkubasi dengan DAB, Tunggu 30 menit sampai timbul warna coklat pada jaringan dengan pengamatan di bawah mikroskop. Inkubasi pewarna Meyer 1:100 dalam air kran yang ditunggu 20 menit sampai timbul warna ungu pada jaringan dengan pengamatan di bawah mikroskop. Setelah itu dilakukan pencucian menggunakan air kran sampai sisa-sisa Meyer hilang. Lakukan pengeringan preparat pada suhu ruang dan dilakukan fiksasi menggunakan cover glass menggunakan larutan Entelan.

4.9 Analisa dan Pengumpulan Data

Hasil pengukuran ekspresi TGF- β 1 pada kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistic dengan program SPSS 16.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji one-way ANOVA, post hoc test (uji *Least Significant Difference*) dan uji korelasi Pearson

