

BAB 4

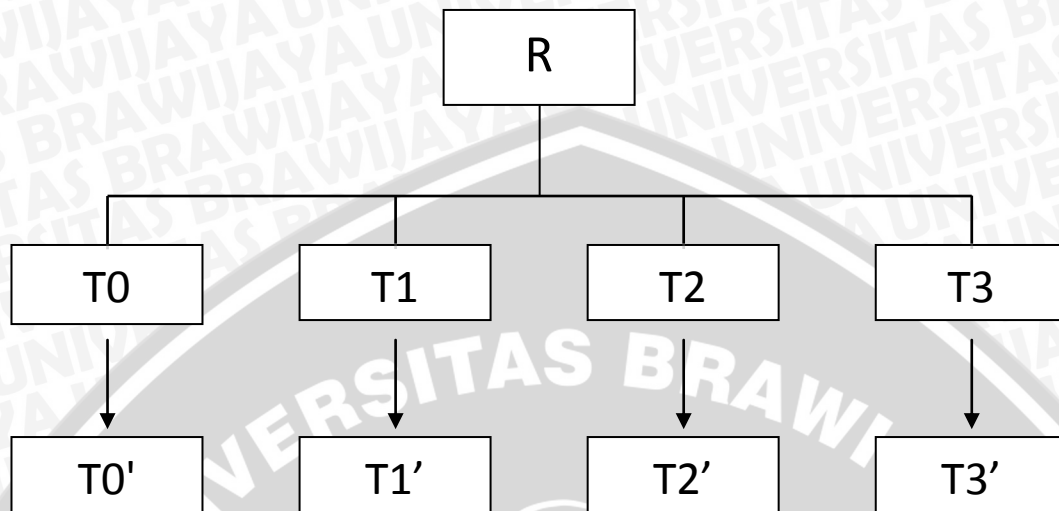
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental di laboratorium secara *in vivo* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara kadar malondialdehid (MDA) jaringan dan derajat fibrosis hati tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄). CCl₄ diberikan via injeksi peritoneal sebanyak dua kali seminggu dan dilanjutkan hingga mencapai derajat fibrosis, berdasarkan waktu kejadian fibrosis hati dan mengacu pada percobaan sebelumnya yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stages in Rats* yang memakai standar *Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis* yang ditetapkan pada *10th World Digestive Disease Academic Conference* sebagai standar derajat fibrosis hati. Kemudian, tikus dibedah dan diamati derajat fibrosis hatinya menggunakan pewarnaan histopatologi dan ekspresi dari malondialdehid (MDA) jaringannya.

Semua tikus akan diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari sebelum diberi perlakuan. Kelompok perlakuan T0 merupakan kelompok kontrol negatif dan dianggap sebagai fibrosis derajat 0. Kelompok perlakuan T1 adalah kelompok yang diberi perlakuan injeksi CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/kgBB sebanyak 2 kali seminggu selama 2 minggu sebagai fibrosis derajat I. Kelompok perlakuan T2 adalah kelompok yang diberi perlakuan injeksi CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/kgBB sebanyak 2 kali seminggu selama 5 minggu sebagai fibrosis derajat II. Kelompok perlakuan T3 merupakan kelompok yang diberi perlakuan penyuntikan CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/kgBB sebanyak 2 kali seminggu selama 9 minggu sebagai fibrosis derajat III.

Metode yang digunakan pada percobaan ini adalah *Post Test Only Control Group* dengan rincian bagan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Rancangan Percobaan *Post Test Only Control Group*

Keterangan :

T0 : Kelompok Kontrol Negatif yang diinjeksi menggunakan NaCl 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu sebagai fibrosis derajat 0

T1 : Kelompok Perlakuan 1 yang diinjeksi dengan CCl₄ 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu sebagai fibrosis derajat I

T2 : Kelompok Perlakuan 2 yang diinjeksi dengan CCl₄ 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu sebagai fibrosis derajat II

T3 : Kelompok Perlakuan 3 yang diinjeksi dengan CCl₄ 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu sebagai fibrosis derajat III

T0' : Pengamatan kadar MDA jaringan setelah perlakuan T0

T1' : Pengamatan kadar MDA jaringan setelah perlakuan T1

T2' : Pengamatan kadar MDA jaringan setelah perlakuan T2

T3' : Pengamatan kadar MDA jaringan setelah perlakuan T3

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan jenis *Rattus Norvegicus* galur *Wistar* berusia 2-3 bulan.

4.2.2 Sampel

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen. Perhitungan besarnya jumlah pengulangan pada sampel penelitian ditentukan dengan menggunakan rumus (Notobroto, 2005):

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

dimana,

t : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan

Nilai t=4 sehingga jumlah pengulangan yang diperlukan adalah:

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

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan rumus di atas, diperlukan sampel penelitian sebanyak 6 ekor tikus setiap kelompoknya sehingga diperlukan total 24 ekor tikus dengan rincian sebagai berikut:

Tabel 4.1. Rancangan Jumlah Sampel dan Kelompok Perlakuan

Kelompok	Macam Diet dan Perlakuan	Jumlah Tikus
Kontrol Negatif (N)	Diet normal dan diinjeksi NaCl 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu sebagai kontrol.	6 ekor
Perlakuan T1	Diet normal dan diinjeksi CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu.	6 ekor
Perlakuan T2	Diet normal dan diinjeksi CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu.	6 ekor
Perlakuan T3	Diet normal dan diinjeksi CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu.	6 ekor

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus berjenis kelamin jantan
- Usia 2-3 bulan
- Berat badan 280-300 gram
- Kondisi sehat dan aktif
- Tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian
- Tikus yang sakit selama masa perlakuan
- Tikus yang mati selama perlakuan

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus dinyatakan *drop out* bila sesuai dengan kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain sesuai dengan kriteria inklusi sehingga jumlah tikus yang didapat sesuai dengan ketentuan besar sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah derajat fibrosis yang terjadi pada hati tikus dan lama waktu paparan karbon tetraklorida (CCl₄). Paparan ini bertujuan untuk menginduksi beberapa derajat fibrosis hati. Besar dosis dan lama waktu pemberian CCl₄ mengacu pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* oleh Li dkk pada tahun 2012.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid jaringan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl₄ dan analisa kadar malondialdehid jaringan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran derajat fibrosis hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian ± 3 bulan yaitu Maret-Mei 2014.

4.5 Instrumen dan Bahan Penelitian

4.5.1 Instrumen Penelitian

- Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang kotak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang, sekam, dan penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

- Alat Pembuat Makanan Tikus

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan

- Alat Pembedahan dan Pengambil Jaringan

Gunting bedah, spuit 5 mL, dan tabung organ.

- Alat Pemeriksaan Kadar Malondialdehid Jaringan

Timbangan, mortar, *vortex*, *centrifuge*, *water bath*, spektrofotometri.

- Alat Pengukuran Derajat Fibrosis

Microfon rotatory sliding, *water bath*, kaca obyek, mikroskop.

- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl_4

Pipet, *beaker glass*, spatula, spuit 1 mL.

4.5.2 Bahan Penelitian

- Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.

- Bahan pembuatan pakan standar:

Pakan standar tikus Wistar berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%

Bahan makanan :

- Jumlah makanan rata-rata 40 g/hari untuk setiap tikus

- Pakan normal mengandung konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- Pemberian diberikan secara rutin
- Bahan pembuatan dan pemberian larutan CCl_4 : CCl_4 , minyak jangung, spet, kapas, alkohol.
- Bahan bedah tikus: alkohol, kapas, gunting, ether.
- Bahan untuk pemeriksaan malondialdehid jaringan: jaringan hati tikus, gunting bedah, *buffer* Tris KCl/fosfat pH 7,4, Triton X 0,1%, HCl 1N, TCA, *Na-Thiobarbiturat Acid*, akuades.
- Bahan penentuan derajat fibrosis hati: formalin 10% , aseton, *xylol*, parafin cair, parafin blok, *mayer albumin*, pewarnaan *Hematoxyllin Eosin*, alkohol 95%, air, *hematoxilin*, lithium karbonat.

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan umur \pm 2 bulan dan berat 150-200 gram serta dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (T0), kelompok T1, kelompok T2, dan kelompok T3.

2. Kadar Malondialdehid Jaringan

Kadar malondialdehid jaringan adalah jumlah malondialdehid yang terdapat dalam jaringan hati yang didapat dari hasil analisis dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay*.

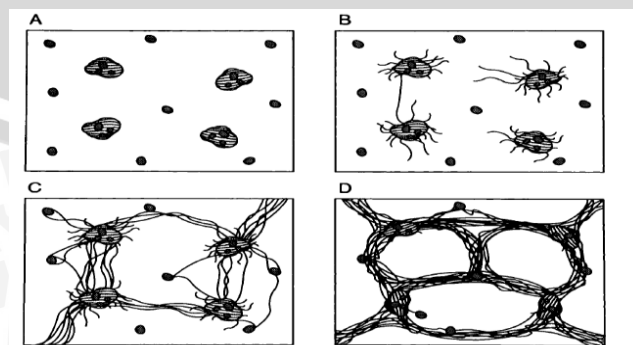
3. Paparan CCl_4

Paparan CCl_4 yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl_4 sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0 mL/kgBB 2 kali seminggu selain

kelompok T0, dengan lama paparan sesuai dengan derajat fibrosis yang akan dicapai, dan berpedoman pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* oleh Li dkk pada tahun 2012.

4. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
5. Derajat fibrosis hati, menggunakan *Criteria of Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis* dengan menggunakan interpretasi sebagai berikut: S0 = Tidak ada fibrosis; S1 = Fibrosis terlokalisasi pada areal portal tanpa septa, dengan gambaran fibrosis perisinusoidal dan interlobular fibrosis; S3 = Terbentuknya banyak septa dengan diikuti kerusakan struktur intralobular, tanpa adanya sirosis; S4 = Sirosis hepar tahap awal. Setiap derajat fibrosis yang terjadi diberi skor untuk penilaian pada analisa hasil penelitian berikut:
 - a. S0 = Tidak ada fibrosis mendapat skor 0
 - b. S1 = Fibrosis derajat 1 mendapat skor 1
 - c. S2 = Fibrosis derajat 2 mendapat skor 2
 - d. S3 = Fibrosis derajat 3 mendapat skor 3

Pemeriksaan Histopatologi menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan fibrosis diamati dengan mikroskop cahaya.



Gambar 4.2 Ilustrasi *staging* pada fibrosis hati A=S1 (fibrosis derajat 1), B=S2 (fibrosis derajat 2), C=S3 (fibrosis derajat 3), D=S4 (sirosis hepar) (Brunt, 1999)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
3. Memasukkan tikus kedalam kandang yang dibuat dari bak plastik dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih jantan selama 7 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan. Pada masa adaptasi berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
4. Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol negatif, dan perlakuan dengan setiap kelompok berisi 16 tikus.
5. Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 3 hari sekali.
6. Memberikan minum dengan akuades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
7. Memberikan pakan yang berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
8. Menginduksi CCl_4 dengan disuntikkan intraperitoneal dosis 1,0 mL/kgBB setiap 72 jam pada kelompok perlakuan.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl₄

1. Mengambil CCl₄ dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari
2. Melarutkan CCl₄ dengan minyak jagung sebanyak 1:1 didalam beaker glass, yaitu untuk CCl₄ sebanyak 5 mL dan minyak jagung 5 mL dengan konsentrasi 50%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.
3. Pengambilan larutan CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/kgBB/72 jam.
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Menginduksi CCl₄ dilakukan setiap 72 jam. Sebelum melakukan penyuntikan terlebih dahulu membersihkan daerah yang akan disuntik dengan kapas yang diberi alkohol dengan gerakan melingkar agar steril, dan perlu dipastikan sebelum melakukan penyuntikan tidak ada udara karena udara dapat menyebabkan emboli.

4.7.3 Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Setelah 72 jam pemberian CCl₄ pertama, salah satu tikus dari setiap kelompok di bedah untuk diperiksa derajat fibrosis dan ekspresi malondialdehidnya.
2. Tikus dianastesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ organ dalam rongga abdomen terlihat.
5. Dilakukan pengambilan darah tikus yang diambil dari ventrikel jantung dengan menggunakan jarum suntik untuk membunuh tikus.

6. Jaringan hati tikus diparfusi dengan menggunakan PBS untuk membersihkan kandungan sel darah.
7. Jaringan hati tikus diambil dengan menggunakan gunting bedah, dimasukkan ke dalam tabung organ, serta dimasukkan ke dalam freezer -20°C

4.7.4 Pengukuran Kadar Malondialdehid Jaringan

Pengukuran kadar malondialdehid jaringan dilakukan dengan menggunakan *Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay* dengan asam thiobarbiturat sebagai reagen dan hasil akhir menggunakan satuan ng/ μL . Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Sampel berupa jaringan hati tikus, ditimbang seberat 0,2 g (200mg), dan kemudian digerus dengan menggunakan mortar sampai halus.
2. Tambahkan 2 mL *buffer* Tris KCl atau *buffer* fosfat pH 7,4 dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
3. Tambahkan 100 μL Triton X 0,1%, vortex hingga homogen.
4. Tambahkan 100 μL TCA 100% untuk presipitasi, vortex hingga homogen.
5. Tambahkan 200 μL HCl 1N, vortex hingga homogen.
6. Tambahkan 100 μL *Na-Thiobarbiturat* 1%, vortex hingga homogen.
7. Tambahkan 0,5 mL akuades ke dalam tabung reaksi, vortex hingga homogen.
8. Panaskan tabung reaksi dalam *waterbath* dengan suhu 105°C selama 30 menit, kemudian angkat dan biarkan dingin dalam suhu ruangan (25°C).
9. Masukkan tabung reaksi ke dalam mesin sentrifuge dengan kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit pada suhu kamar (25°C).

10. Setelah selesai disentrifuge, ambil supernatan dengan menggunakan pipet.
11. Tambahkan aquabidest pada supernatan hingga mencapai volume 3 mL.
12. Lakukan pembacaan hasil dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 532 nm (karena MDA stabil dalam waktu agak lama), kemudian catat hasil arsorbansi gelombangnya.
13. Konsentrasi hasil malondialdehid jaringan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Conc} = \frac{\text{Abs} - 0,0231}{0,449}$$

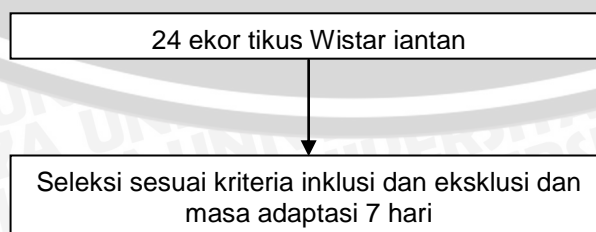
4.7.5 Pengamatan Histopatologi Fibrosis Hati

Pertama dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan daripada fiksasi adalah untuk mengawetkan sel-sel melalui proses denaturalisasi protein, sehingga struktur inti sel tidak berubah. Lalu dilakukan pencucian dengan cara mencuci *gross* dengan air mengalir 15 menit untuk menghilangkan sisa-sisa bahan fiksasi dehidrasi.

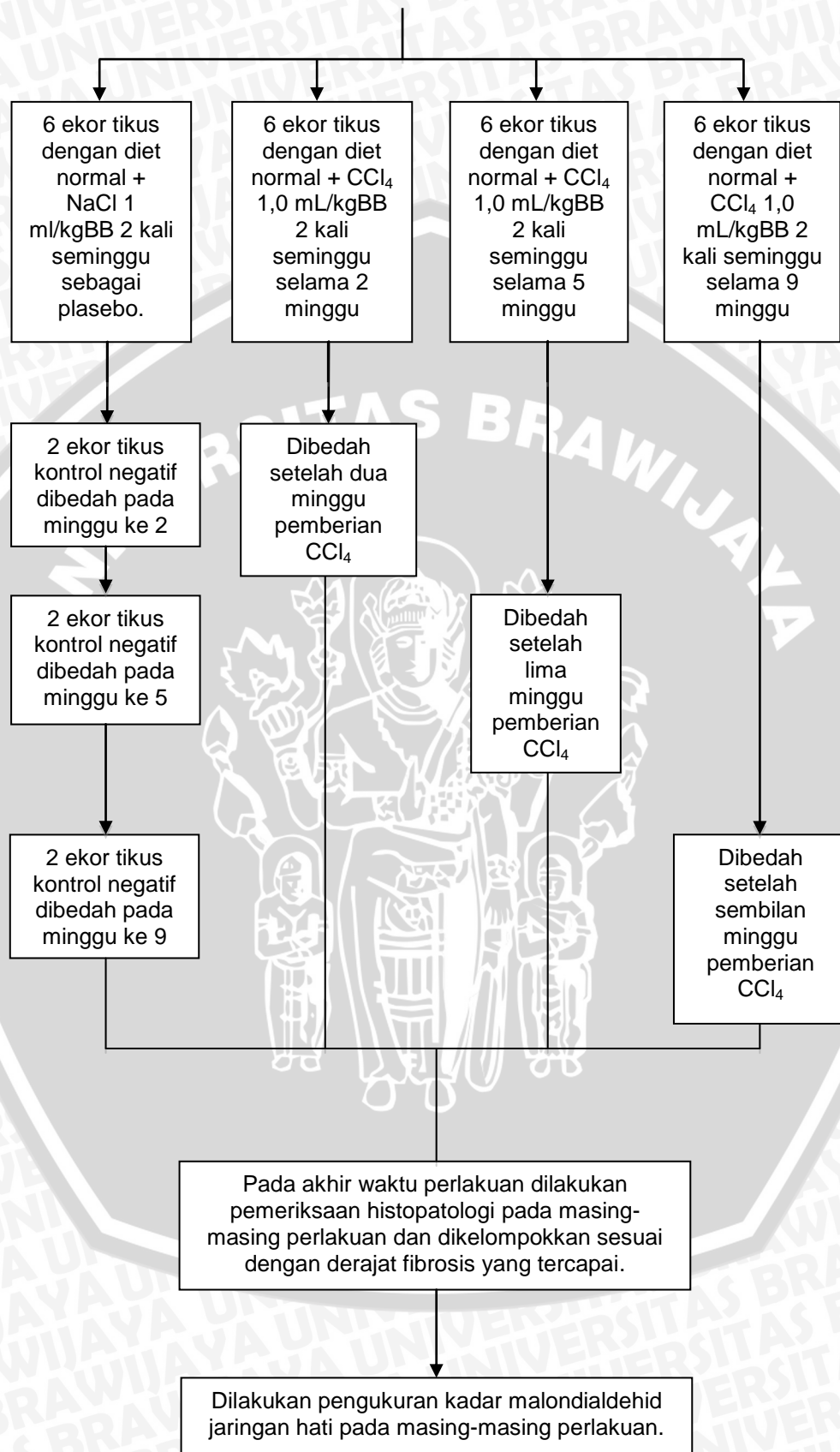
Kedua dilakukan *embedding*. Potongan jaringan hati direndam ke dalam aseton 4x1 jam. Lalu, potongan jaringan hati direndam ke dalam *xylol* selama 4x1 jam. Setelah itu, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin cair (suhu 60°C) selama 4x1 jam. Terakhir, potongan jaringan hati direndam ke dalam parafin blok selama 24 jam.

Ketiga dilanjutkan dengan penyayatan. Potongan jaringan hati disayat dengan *microfon rotatory/sliding* dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan ditaruh pada *waterbath* (suhu 60°C). Sayatan ditaruh pada obyek glass yang telah terlebih dahulu diusap dengan mayer albumin, diamankan selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Preparat dicelupkan pada *xylol* selama 3 x 15 menit. Preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3x15 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat diwarnai dengan *hematoxylin* selama 15 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya preparat dicelupkan pada alkohol asam 1 dip. Lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dicelupkan pada litium karbonat 1 dip. Selanjutnya, preparat dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, dan dicelupkan pada eosin 15 menit. Terakhir, preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3x15 menit dan ditutup dengan obyek glass pada perekatan entelan/*canada balsam*. Eosin akan memberikan warna merah pada membran sel, sedangkan *hematoxylin* akan memberikan warna biru-ungu pada inti sel. Pewarnaan ini akan memperjelas struktur berbagai jenis sel yang ada di dalam jaringan hepatosit hati. Pengamatan dan pengambilan gambar histologis dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

4.7.6 Bagan Alur Penelitian



(dilanjutkan pada halaman 39)



Gambar 4.3. Bagan Alur Penelitian



4.8 Metode Analisis Data

Pengolahan data menggunakan piranti lunak (*software*) IBM® *Statistical Product and Service Solution (SPSS®) Statistics for Windows, Version 22.0*.

Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05. Langkah-langkah uji hipotesisnya adalah sebagai berikut (Santoso, 2014):

- a. *Test of Homogeneity of Variance* untuk melihat kesamaan ragam data.
- b. Uji normalitas untuk melihat distribusi data menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 .
- c. Jika uji normalitas dan homogenitas terpenuhi maka analisis data dilanjutkan dengan *One-Way ANOVA* untuk mengevaluasi apakah ada perbedaan bermakna dari rata-rata dari kadar malondialdehid jaringan pada setiap derajat fibrosis hati. Setelah itu dilakukan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk menilai perlakuan mana yang mempunyai beda kadar malondialdehid jaringan yang signifikan.
- d. Jika uji normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi maka analisis data dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk uji komparatif antara derajat fibrosis hati dan kadar malondialdehid jaringan. Setelah itu, dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang memberikan gambaran signifikan terhadap kadar malondialdehid jaringan.
- e. Uji Korelasi Spearman dilakukan sebagai uji korelatif (hubungan) baik saat uji normalitas dan homogenitas terpenuhi ataupun tidak karena tingkatan data terendah yang ada dalam penelitian ini berupa data ordinal. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kekuatan dan arah hubungan antara variabel numerik dan ordinal, yaitu kadar malondialdehid jaringan dan derajat fibrosis hati.