

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan yang diinjeksi CCl_4 (*carbon tetrachloride*) secara intraperitoneal dengan dosis 1 ml/kgBB, diberikan dua kali seminggu selama enam minggu untuk menginduksi terjadinya fibrosis hepar mengacu pada penelitian Fan X, *et al.* (2013) Dosis pemberian ekstrak *beta glucan* mengacu pada penelitian Cramer *et al.* (2008) yaitu 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit Balb/C jantan berusia 6-7 minggu. Pemilihan mencit jantan ini sesuai dengan penelitian Fan X, *et al.* (2013). Berikut ini adalah perhitungan besarnya pengulangan sampel (Anshori dan Iswati, 2009):

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

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini $t = 5$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

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

$$r \geq 3.75 + 1$$

$$r \geq 4.75$$

jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 5, sehingga total hewan coba yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 25 ekor.

4.2.2 Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian berjumlah 5 (lima) yang dibagi secara acak (K_n, K_p, P_1, P_2, P_3), dengan ketentuan sebagai berikut:

- Kelompok kontrol negatif (K_n): 5 ekor mencit sehat (tanpa diinduksi CCl_4 dan tanpa pemberian ekstrak *beta glucan*).
- Kelompok kontrol positif (K_p): 5 ekor mencit diinduksi CCl_4 .
- Kelompok perlakuan (P_1): 5 ekor mencit diinduksi CCl_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 25 mg/kgBB.
- Kelompok perlakuan (P_2): 5 ekor mencit diinduksi CCl_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 50 mg/kgBB.
- Kelompok perlakuan (P_3): 5 mencit diinduksi CCl_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 100 mg/kgBB.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

- Perawatan dan pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

- Proses ekstraksi *beta glucan* dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Proses pembuatan preparat histopatologi jaringan hepar dengan pewarnaan hematoxylin eosin (HE) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan dari bulan Februari hingga bulan Juli 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian CCl_4 sebesar 1 ml/kgBB dan pemberian ekstrak *beta glucan* ragi *Saccaromyces cerevisiae* dengan dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB.

4.4.2 Variabel Tergantung

Perbaikan jaringan hepar secara histopatologi yang dilihat dari susunan dan kondisi hepatosit dan vena sentralis.

4.5 Definisi Operasional

1. Ragi yang digunakan yaitu ragi *Saccaromyces cerevisiae* jenis yang digunakan untuk pembuatan tempe. Ragi ini bisa dibeli di mana saja.
2. *Carbon tetrachloride* (CCl_4) di dapat dari lab farmakologi. Merupakan zat yang terbukti mampu menginduksi fibrosis dan sirosis (Domitrović, 2009).

3. *Beta glucan*: Hasil ekstraksi dari *Saccharomyces cerevisiae* yang diekstrak dengan metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian Hunter *et al.* (2002)
4. Histopatologi hepar: kondisi hepatosit dan vena sentralis

4.6 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

4.6.1 Bahan

Berikut adalah bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Bahan untuk perawatan hewan coba: sekam, air minum, dan pakan *corn feed* (makanan standar mencit).
2. Bahan untuk induksi mencit model fibrosis hepar: CCl₄, kapas, alkohol 70%.
3. Bahan untuk pembuatan ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae*: Ragi roti kering, HCl 3% 500ml, H₂O₂ 3% 120 ml, *acetone* 100%, aquades steril.
4. Bahan untuk pembedahan tikus: kapas, kloroform 20 ml, alkohol 70%, dan formalin 10 % 200 ml.
5. Bahan untuk pembuatan preparat: *xylol*, paraffin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 96%, larutan eosin 1%, Meyer's Hematoksilin, EZ *Mount*, kertas saring.

4.6.2 Alat

Berikut adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Alat untuk perawatan hewan coba: kandang plastik yang dilengkapi dengan botol minum, tempat makanan, dan penutup kandang berupa jaring-jaring kawat, timbangan analitik, *handscoon*, dan pembersih kandang.

2. Alat untuk induksi mencit model fibrosis hepar: spuit 1 cc untuk injeksi *intrapertoneal*
3. Alat untuk pembuatan ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae*: mesin sentrifuge, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, alat *freeze dryer*, tabung Erlenmeyer, pipet, *blue tip*, gelas beker.
4. Alat untuk pembedahan tikus: gunting bedah, steroform, pinset, jarum pentul, spuit insulin 1 cc, vacutainer dengan dan tanpa EDTA, botol organ.
5. Alat untuk pembuatan preparat: *incubator*, *object glass*, *cover glass*, mikrotom, pinset, *automatic tissue processing*, *holder staining*, *auto stainer*.
6. Alat untuk pembacaan hasil histopatologi: mikroskop dan komputer yang terhubung

4.7 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data penelitian ini dilakukan dengan mengikuti alur prosedur penelitian sebagai berikut:

4.7.1 Perlakuan Hewan Coba

1. Hewan coba (mencit Balb/C) sebanyak 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 5 ekor untuk masing-masing kelompok.
2. Mencit ditempatkan dalam kandang terpisah (setiap kandang berisi satu ekor mencit).
3. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar mencit dapat beradaptasi dalam kondisi penelitian.

4. Selama penelitian berlangsung, makanan dan minuman diberikan satu kali sehari. Sekam diganti setiap 2 hari sekali dan kandang dicuci setiap 1 minggu sekali.
5. Pada akhir penelitian, semua tikus di-euthanasia menggunakan inhalasi kloroform, kemudian diambil organ hatinya sebagai bahan pengecekan perbaikan jaringan hepar.

4.7.2 Induksi Fibrosis Hepar

1. Sebelum dilakukan penyuntikan, mencit ditimbang untuk menghitung dosis CCl_4 yang diinjeksikan. Masing-masing mencit memperoleh 1 ml/kgBB CCl_4
2. Mencit dipegang dengan posisi yang nyaman agar tidak terlepas saat injeksi CCl_4
3. Dilakukan antisepsis dengan menggunakan alkohol 70% yang diusapkan menggunakan kapas di bagian yang akan disuntik.
4. CCl_4 diinjeksikan secara intraperitoneal menggunakan spuit 1 cc. Pemberian CCl_4 dilakukan sebanyak 2 kali seminggu selama 6 minggu.

4.7.3 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak *Beta Glucan*

- a. Pembuatan ekstrak *beta glucan*
 1. Ragi roti kering sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 1000ml/1 liter
 2. Ditambahkan 600 ml NaOH konsentrasi 1 M/ liter dan dicampur menggunakan stirrer pada suhu 60°C .
 3. Dilakukan pemanasan menggunakan autoclave pada suhu 115°C selama 45 menit kemudian dibiarkan selama 3 jam.

4. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit dalam suhu ruang. Supernatan dibuang dan biarkan pelet yang berada dalam tabung. Tambahkan larutan sisanya untuk disentrifuse kembali. Ulangi prosedur ini hingga semua larutan selesai disentrifuse.
5. Endapan dalam tabung diambil dengan HCl 3% menggunakan mikropipet untuk dipindahkan ke dalam gelas beker dan sisa HCl juga dimasukkan ke dalam gelas beker.
6. Dilakukan sentrifugasi pada larutan yang telah ditambah HCl 3% dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit dengan suhu ruang. Supernatan dibuang dan pellet dibiarkan. Sentrifugasi dilakukan sampai seluruh larutan habis.
7. Endapan kemudian dilarutkan (resuspensi) dengan aquades steril untuk disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang
8. Endapan dicampur dengan H₂O₂ 120 ml dan disimpan dalam refrigerator 4°C selama 3 jam.
9. Kemudian larutan disentrifuse pada suhu 20 °C dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang
10. Dilakukan resuspensi endapan menggunakan aseton 100%. Kebudian tabung diisi penuh dengan aseton. Lalu disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit pada suhu 20 °C.
11. Endapan diresuspensi menggunakan mikropipet dan aquades dan dipindah ke dalam valcon untuk disimpan pada suhu 4 °C.

12. Dilakukan *ultrasonic extraction* dengan amplitudo 50% selama 12 menit.
 13. Dilakukan uji FTIR (*Fourier Transferred Infrared*) untuk memastikan bahwa hasil ekstraksi memiliki gugus-gugus ion yang sama dengan *beta glucan*.
 14. Hasil ekstraksi dikeringkan dengan metode *freeze dry* sehingga menjadi bubuk
- b. Pemberian ekstrak *beta glucan*
1. Bubuk ekstrak diencerkan dalam aquades sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Agar tercampur homogen, dilakukan *vortexing*.
 2. Ekstrak dimasukkan ke dalam spuit 1 cc yang telah dipasang dengan ujung khusus sonde
 3. Mencit dipegang dengan posisi yang nyaman agar tidak merasa kesakitan.
 4. Ekstrak *beta glucan* disondekan pada masing-masing perlakuan sesuai dosis yang telah ditentukan. Penyondean dilakukan 1 kali setiap hari selama 2 minggu.

4.7.4 Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Mencit yang sudah diberi anestesi dibaringkan di atas sterofoam, difiksasi, lalu dibedah mulai dari perut. Organ hepar diambil dan difiksasi dalam formalin 10% untuk proses pembuatan preparat lebih lanjut

4.7.5 Prosedur Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Penanganan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu dengan penguburan.

4.7.6 Prosedur Pembuatan Preparat

a. Memproses bahan/jaringan

1. Dehidrasi dengan tujuan untuk menarik air secara bertahap. Dilakukan dalam 4 tabung. Tabung pertama berisi formalin 10% direndam selama 5-8 jam, tabung kedua sampai keempat berisi aceton-1 – aceton-3 direndam selama 0.5 jam.
2. *Clearing* (penjernihan) dengan tujuan untuk mentransparankan serta mengganti alkohol dari jaringan dengan menggunakan Xylol dalam tiga buah tabung dengan masing-masing perendaman selama 0.5 jam.
3. Impregnasi yang bertujuan untuk menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan dengan menggunakan paraffin cair (58-60°C) dalam dua tabung dengan durasi pertama selama 0.5 jam, dan kedua selama 1 jam.
4. *Embedding* (pengeblokan) yang bertujuan untuk memudahkan penyayatan dengan mikrotom dengan cara:
 1. Alat cetak disusun di atas alas yang permukaannya halus dan rata, misal kaca yang diolesi dengan gliserin.
 2. Siapkan paraffin cair dengan suhu optimum (cukup cair) tetapi tidak mengembungkan alat cetak blok (logam).
 3. Tuangkan paraffin cair ke dalam alat cetak hingga penuh.

4. Bila paraffin pada alat pencetak sudah cukup keras, alat cetak dilepas dan dilakukan pemotongan blok dengan silet pada ukuran tertentu.
- b. Pemotongan blok paraffin dengan mikrotome
1. Blok ditempatkan pada alat pemegang blok dengan bantuan lempengan besi tipis yang telah dipanaskan
 2. Dinginkan pada suhu kamar sampai melekat erat.
 3. Persiapkan Rotary Mikrotome, ketajaman pisau dan sudut kemiringan.
 4. Persiapkan Water Bath, kebersihan dan temperatur air (di bawah titik leleh paraffin).
 5. Persiapkan obyek glass, perekat (telur dengan gliserin), label.
 6. Blok yang sudah menempel pada alat pemegang blok dipasang pada mikrotom dan atur ketebalan sayatan.
 7. Lakukan penyayatan blok, lalu angkat sayatan dan masukkan ke dalam water bath agar sayatan mengembang dengan baik.
 8. Pilih sayatan terbaik dan angkat dengan obyek glass sesuai label, lalu keringkan pada suhu kamar.
- c. Deparafinisasi
1. Masukkan sayatan ke dalam oven dengan suhu 70°C selama 1 jam.
 2. Masukkan ke dalam Xylol sebanyak tiga kali, masing-masing 5 menit.

4.7.7 Pengecatan Preparat dengan Hematoksilin dan Eosin

Preparat yang telah selesai diproses tersebut kemudian dilakukan hidrasi dengan alkohol 96% sebanyak tiga kali masing-masing 2 menit. Masukkan ke dalam air selama 10 menit. Tetesi dengan cat utama Meyer's Hematoksilin selama 10 menit, cuci dengan air mengalir selama 20 menit. Celupkan ke dalam alkohol asam 1% sebanyak 3-5 celup, lalu amonia air sebanyak 5-10 celup. Kemudian, tetesi dengan cat perbandingan Eosin 1% selama 0.5-1 menit. Setelah itu, lakukan dehidrasi dengan menggunakan alkohol 80% selama 2 menit, dan alkohol 96% dua kali masing-masing 2 menit. Lakukan *clearing* (penjernihan) dengan menggunakan xylol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Setelah itu, lakukan mounting dengan meletakkan entelan di atas obyek glass dan kemudian merekatkannya dengan *deckglass*.

4.7.8 Pemeriksaan Histologi untuk Melihat Jaringan Hepar

Pengamatan gambaran histopatologi dilakukan dengan pengambilan gambar terlebih dahulu menggunakan *Olympus Digital Camera* dengan pembesaran mikroskop 10x objektif pada tiap preparat.

4.8 Metode Analisis Data

Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya. Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif dimana gambaran jaringan hepar dijabarkan sebagaimana adanya dan tidak diubah dalam bentuk simbol ataupun bilangan. Gambaran jaringan hepar yang akan dinilai adalah bentuk, susunan, dan keadaan hepatosit dan vena sentralis.