

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Pekan Kreativitas Mahasiswa (PKM) dengan judul : Pengembangan Terapi Fibrosis Hepar menggunakan *Beta Glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* Berbasis Mobilisasi *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs).

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Induksi CCl_4 (*carbon tetrachloride*) yang bertujuan untuk menginduksi fibrosis hepar mengacu pada penelitian Fan, *et al* (2013) yaitu dengan dosis sebesar 1 ml/kg BB, dua kali seminggu selama enam minggu.

4.2 Populasi dan Sampel**4.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini ada seluruh mencit galur Balb/C. Sedangkan sampel adalah mencit galur Balb/C jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan penelitian.

4.2.2 Kriteria Sampel

Hewan coba mencit Balb/C yang digunakan pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Berikut ini adalah kriteria mencit yang digunakan pada penelitian ini :

Kriteria Inklusi :

- a) Mencit galur Balb/C jantan, karena mencit jantan memiliki hormon yang lebih stabil dibanding betina.
- b) Usia 6-7 minggu
- c) Berat badan \pm 30-35 gram.
- d) Sehat, yang ditandai dengan bergerak aktif.

Kriteria Eksklusi :

- a) Mati selama penelitian berlangsung
- b) Mempunyai kelainan anatomi atau cacat fisik
- c) Anemia aplastik

4.2.3 Besaran Sampel

Sampel penelitian adalah mencit Balb/C jantan berusia 6-7 minggu. Pemilihan mencit jantan ini sesuai dengan penelitian Fan, *et al* (2013). Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Solimun, 2001):

$p(n-1)$	≥ 15
$5(n-1)$	≥ 15
$5n - 5$	≥ 15
$5n$	≥ 20
n	≥ 4

Keterangan :

p : jumlah perlakuan

n : jumlah replikasi atau ulangan

Dari hasil perhitungan, diperlukan jumlah replikasi atau ulangan paling sedikit adalah 4 kali untuk masing masing kelompok, sehingga jumlah total

mencit yang dibutuhkan dalam penelitian ini secara keseluruhan adalah sejumlah 20 ekor mencit.

4.2.4 Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian berjumlah 5(lima) yang dibagi secara acak dengan ketentuan sebagai berikut :

- a) Kelompok kontrol negatif : mencit sehat (tanpa diinduksi CCL_4 dan tanpa pemberian ekstrak *beta glucan*.
- b) Kelompok kontrol positif : mencit diinduksi CCL_4 dan tanpa pemberian ekstrak *beta glucan*.
- c) Kelompok perlakuan 1 : mencit diinduksi CCL_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 25 mg/kgBB.
- d) Kelompok perlakuan 2 : mencit diinduksi CCL_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 50 mg/kgBB.
- e) Kelompok perlakuan 3 : mencit diinduksi CCL_4 dan diberikan ekstrak *beta glucan* dengan dosis 100 mg/kgBB.

4.2.5 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah menggunakan teknik *simple random sampling* menggunakan rancangan acak kelompok(RAK). Sampel dibagi kedalam kelompok secara acak dan setiap hewan coba memiliki kesempatan yang sama untuk masuk ke dalam suatu kelompok. Metode yang digunakan adalah sistem *lotree*, sebanyak dua kali. *Lotree* pertama menentukan kelompok yang akan diambil terlebih dahulu, sedangkan *lotree* kedua untuk mengelompokan hewan coba.

Dalam menentukan kelompok mana yang akan diambil terlebih dahulu maka digunakan *lotree* dengan 5 macam kertas, yakni kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3. Kertas yang lebih dulu keluar adalah kelompok yang lebih dulu ditentukan anggotanya. Selanjutnya untuk mengelompokkan hewan coba, masing masing hewan coba diberi nomor 1-20 dan dilakukan *lotree* untuk menentukan kelompok dari masing-masing hewan coba dengan melakukan pengambilan nomor *lotree* 4 kali untuk 1 kelompok penelitian. Kertas atau nomor *lotree* yang sudah diambil tidak boleh dimasukkan kembali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

- Perawatan, perlakuan dan pembedahan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Pembuatan ekstrak *beta glucan* dari Ragi *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Pembuatan preparat dan Pengukuran penurunan kadar CD34⁺ didalam darah dilakukan menggunakan alat *flowcytometry* di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, yaitu dimulai dari Maret 2015 hingga Juni 2015.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah CCL₄ sebesar 1 ml/kgBB, *beta glucan* ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang dibagi menjadi 6 kelompok sebagai berikut :

1. Kelompok kontrol negatif : mencit sehat (tanpa diinduksi CCL₄ dan tanpa pemberian ekstrak.
2. Kelompok kontrol positif : mencit diinduksi CCL₄
3. Kelompok perlakuan 1 : mencit diinduksi CCL₄ dan diberikan ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 25 mg/kgBB
4. Kelompok perlakuan 2 : mencit diinduksi CCL₄ dan diberikan ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 50 mg/kgBB
5. Kelompok perlakuan 3 : mencit diinduksi CCL₄ dan diberikan ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 100 mg/kgBB

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah *flowcytometry* penurunan ekspresi CD34⁺ didalam darah.

4.5 Definisi Operasional

1. *Beta glucan* yang digunakan didapatkan dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* jenis yang digunakan untuk pembuatan roti. Ragi ini bisa dengan mudah didapatkan dimana saja. Bentuk sediaan ragi ini berupa bubuk.
2. *Beta glucan* yang dihasilkan dari penelitian ini didapatkan dari proses ekstraksi ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

3. *Carbon tetrachloride* (CCL₄) merupakan zat yang mampu menginduksi fibrosis dan sirosis pada hepar. *Carbon tetrachloride* (CCL₄) yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Farmakologi. Sediaan *Carbon tetrachloride* (CCL₄) yang didapatkan diencerkan menggunakan minyak jagung dan diberikan secara intraperitoneal.
4. Mencit galur balb/c merupakan hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini. Mencit yang digunakan berjenis kelamin jantan dengan usia 6-8 minggu dan berat 30-35 gram.
5. Kelompok kontrol pada penelitian ini terbagi 2 yaitu kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negative yang masing-masing terdiri dari 4 ekor mencit. Pada kelompok kontrol positif dilakukan induksi *carbon tetrachloride* (CCL₄) dengan dosis 1 ml/kgBB secara intraperitoneal. Sementara kelompok kontrol negatif tidak diinduksi *carbon tetrachloride* (CCL₄).
6. Kelompok perlakuan pada penelitian ini terbagi menjadi 3 kelompok dibedakan berdasarkan dosis terapi *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae*. Kelompok perlakuan pada penelitian ini dilakukan induksi *carbon tetrachloride* (CCL₄) dengan dosis 1 ml/kgBB secara intraperitoneal. Kemudian diberikan terapi *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* pada kelompok perlakuan 1 dengan dosis 25 mg/kgBB, kelompok perlakuan 2 dengan dosis 50 mg/kgBB dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis 100mg/kgBB.
7. Kadar ekspresi sel CD34⁺ pada darah mencit yang merupakan marker penanda stem sel diukur menggunakan *flowcytometry*.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

Berikut adalah bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini:

1. Bahan untuk perawatan hewan coba : sekam, air minum, pakan *cornfeed* (makanan standar mencit), dan alkohol 70% untuk memandikan mencit yang disemprotkan tiap hari.
2. Bahan untuk induksi mencit model fibrosis hepar : CCL₄.
3. Bahan untuk pembuatan dan pemberian Ekstraksi *beta glucan* dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* : ragi *Saccharomyces cerevisiae*, NaOH 1M/ 600 ml, aquades, HCl 3% 500 ml, H₂O₂ 3% 120 ml, Acetone 100%.
4. Bahan untuk pembedahan mencit : kloroform 20 ml, alkohol, formalin 10%200ml.
5. Bahan larutan pengencer *carbon tetrachloride* (CCL₄) adalah minyak jagung

4.6.2 Alat

Berikut adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini :

1. Alat untuk perawatan hewan coba : kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, botol minum, alat semprot, tempat makan, handscoen dan pembersih kandang.
2. Alat untuk induksi mencit model fibrosis hepar : spuit injeksi intraperitoneal
3. Alat untuk pembuatan dan pemberian Ekstraksi *beta glucan* dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* : Sentrifugator, pellet dan sonde, stirrer, glass bekker, Erlenmeyer.

4. Bahan untuk pembedahan mencit : steroform 2 buah, gunting bedah, pinset 2 buah, jarum pentul 2 set, kertas label, kapas, *vacutainer* dan tutup 24 buah.
5. Alat yang digunakan untuk melakukan pengukuran terhadap penurunan keda CD34⁺ didarah adalah *flowcytometry*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perlakuan Hewan Coba

1. Hewan Percobaan mencit jantan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 5 kelompok penelitian menggunakan metode rancangan acak kelompok dengan jumlah 4 ekor untuk masing-masing kelompok.
2. Mencit ditempatkan didalam kandang terpisah, setiap kandang berisi 4 ekor mencit.
3. Mencit diadaptasikan selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar mencit dapat beradaptasi dalam kondisi percobaan.
4. Pada saat penelitian berlangsung mencit diberi makanan dan minuman satu kali sehari. Sekam diganti 3 kali seminggu.
5. Pada akhir penelitian, semua mencit di euthanasia menggunakan inhalasi kloroform, kemudian diambil darah melalui jantung dengan menggunakan spuit 1ml.

4.7.2 Induksi Kerusakan Model Fibrosis Hepar

1. Zat yang digunakan untuk menjadikan hewan coba menjadi model fibrosis hepar adalah karbon tetraklorida(CCL₄).
2. Dilakukan pelarutan karbon tetraklorida(CCL₄) didalam minyak jagung dengan perbandingan 1:9.

3. Mencit Balb/C dipuaskan semalam sebelum diinjeksikan
4. Sebelum karbon tetraklorida(CCL₄) diinjeksikan pada hewan coba dilakukan pembersihan daerah yang akan diinjeksi menggunakan kapas yang telah ditetesi oleh alkohol 70%.
5. Karbon tetraklorida(CCL₄) diinjeksikan secara intraperitoneal dua kali seminggu selama enam minggu (Yang, 2009).

4.7.3 Pembuatan dan Pemberian Ekstraksi *Beta Glucan* dari Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

a. Pembuatan Ekstraksi *beta glucan* dari Ragi *Saccharomyces cerevisiae*

1. Zat *beta glucan* didapatkan dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* jenis yang digunakan untuk membuat roti.
2. 100 gram ragi *Saccharomyces cerevisiae* pada roti dicampur dengan NaOH (1M/l) sebanyak 600 mL kedalam tabung Erlenmeyer ukuran 1000ml/1L, lalu dicampur dengan rata menggunakan stirrer pada suhu 60°C selama 30 menit
3. Sampel dipanaskan menggunakan *autoclave* pada suhu 115°C tekanan 8.5 psi / 0,6 kgcm⁻² selama 45 menit dan dibiarkan selama 3 jam.
4. Sampel yang ada didalam Erlenmeyer lalu disimpan di refrigerator pada suhu 4°C.
5. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 2000rpm selama 15 menit pada suhu ruangan.
6. Supernatan pada cairan yang telah disentrifugasi dibuang, pelet biomassa sel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2000rpm selama 15 menit.

7. Sampel dari proses sentrifugasi ditambah aquades kemudian di sentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit.
8. Endapan yang terdapat pada hasil sentrifugasi dengan aquades diambil dengan HCl 3% menggunakan mikropipet, lalu dicuci dengan HCL 3 % sebanyak 500 mL menggunakan sentrifuse 2000 rpm selama 15 menit.
9. Endapan yang terbentuk lalu di sentrifugasi dingin pada suhu 20°C selama 15 menit dengan H₂O₂ 3%.
10. Endapan kemudian dicuci dengan menggunakan acetone 100% sebanyak 2 kali
11. Ekstrak *beta glucan* dalam aquades dilakukan *ultrasonic extraction* dengan amplitude 50% selama 12 menit
12. Hasil ekstraksi kemudian dilakukan Uji *Fourier Transferred Infrared* (FTIR)

b. Pemberian *Beta Glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae*

Pemberian Ekstraksi *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* diberikan secara sonde pada mencit Balb/C. Sebelum disondekan hasil ekstraksi *beta glucan* yang telah dikeringkan dicampur dengan aquades. Ekstrak *beta glucan* disondekan setiap hari selama 4 minggu sesuai dengan dosis masing-masing kelompok.

4.7.4 Pembedahan Hewan Coba

Setelah diberi perlakuan dengan diinduksi karbon tetraklorida(CCL₄) dan diterapi dengan *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* maka dilakukan pembedahan mencit untuk pengambilan sampel darah. Pembedahan dilakukan dengan memberikan anastesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup terlebih dahulu. Setelah mencit tidak sadar, mencit ditaruh dan difiksasi

diatas sterofom. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen.

Ambil darah mencit melalui jantung menggunakan spuit 1 ml.

4.7.5 Prosedur Penanganan Hewan Coba Setelah Penelitian

Penangan hewan coba setelah penelitian mengikuti prosedur di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan cara penguburan.

4.7.6 Pengukuran Penurunan CD34⁺ Menggunakan *Flowcytometry*

Pengukuran penurunan CD34⁺ pada darah mencit model fibrosis hepar dilakukan menggunakan *flowcytometry*. Darah mencit yang telah dimasukan ke dalam *vacutainer* berisi EDTA disentrifugasi preparasi *whole blood* dalam suhu 4⁰C, dengan kecepatan selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa endapat sel dicampur dengan cytoperm atau cytofix sejumlah 2 kali dari jumlah sel yang didapat. Campuran sel dan cytoperm atau cytofix disentrifugasi kembali sehingga didapatkan sup dan pellet. Hasil sentrifugasi berupa pellet kemudian ditambahkan *BD wash* sejumlah 4 kali dari jumlah sel yang didapat pada sentrifugasi pertama. Sentrifugasi campuran tersebut kemudian ditambahkan lisis buffer sejumlah 2 kali jumlah sel awal yang didapat. Setelah itu tambahkan antibody terlabel untuk setiap sampel, lima tabung disiapkan dan diproses secara paralel. Tabung pertama, pewarnaan tunggal dengan CD34 PE ditambahkan ke dalam *wash tube*. Tabung kedua, pewarnaan ganda dengan CD34 PE dan CD35 perCP-*wash tube*. Tabung ketiga, pewarnaan ganda dengan CD34 PE dan CD45 perCP-*trucount tube*. Tabung keempat, reagen isotop kontrol – IgG1 PE dan CD45 perCP-*wash tube*. Tabung kelima, reagen isotop kontrol – IgG1 PE dan CD45 perCP-*trucount tube*. Seluruh sampel kemudian disimpan dalam suhu 4 °C dalam kondisi gelap dan dianalisa menggunakan *flowcytometry* selama 1 jam.

4.8 Pengolahan Data

Seluruh pengolahan data hasil penelitian dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution*, dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Pada penelitian ini akan dianalisa kadar CD34⁺ didalam darah. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar perlakuan pada penelitian ini maka dilakukan uji hipotesis komparatif. Metode yang digunakan adalah uji parametrik *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan alternatifnya yaitu uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Metode *One-Way Anova* dapat digunakan jika data pada penelitian memenuhi syarat-syarat uji parametrik sebagai berikut (Dahlan, 2004) :

1. Terdapat minimal tiga kelompok yang berpasangan
2. Distribusi data normal ($p>0,005$), yang dapat diketahui dari uji normalitas (*Saphiro-Wilk*). Jika distribusi data tidak normal, maka dilakukan transformasi data untuk menormalkan data sehingga didapatkan distribusi data normal.
3. Varians data sama atau homogen ($p>0,05$), yang dapat diketahui dari uji homogenitas (*Chi Kuadrat*). Jika varians data tidak sama atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data untuk menghomogenkan data sehingga didapatkan varians data sama atau homogen.
4. Jika data hasil transformasi tidak berdistribusi normal atau varians tetap tidak sama atau tidak homogen, maka alternatif uji yang digunakan adalah uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Uji *One-Way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menganalisis apakah pada data penelitian terdapat perbedaan hasil yang bermakna antara

masing-masing kelompok perlakuan dengan melihat nilai p. Jika pada uji *One-Way ANOVA* atau *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai $p < 0,05$ disimpulkan bahwa ada pengaruh perbedaan perlakuan yang bermakna terhadap penurunan kadar $CD34^+$ didalam darah dan hipotesis yang menyatakan bahwa pemberian pemberian terapi *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* dapat mempengaruhi kadar $CD34^+$ didalam darah pada mencit model fibrosis hepar diterima. Namun, bila $p > 0,05$ berarti tidak terdapat perbedaan hasil yang bermakna antara masing-masing kelompok perlakuan, dengan kata lain hipotesis tersebut ditolak (Dahlan, 2004).

Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna maka dilakukan uji *Post-Hoc (uji Least Significant Difference)* dengan *Tukey HSD* untuk data yang menggunakan uji *One-Way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney* untuk data yang menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Pada uji *Tukey HSD* jika suatu data didapatkan nilai $p < 0,05$ disimpulkan bahwa data yang diuji berbeda secara signifikan. Untuk mengetahui seberapa kuat hubungan antara pemberian terapi *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* terhadap penurunan $CD34^+$ didalam darah dilakukan uji korelasi *Pearson* dengan alternatifnya adalah uji korelasi *Spearman* untuk uji non parametrik. Uji korelasi *Pearson* bertujuan untuk mengetahui hubungan antara dua variabel. Dari uji korelasi ini dapat diketahui besarnya perbedaan secara kualitatif keolompok yang berbeda secara bermakna yang telah diketahui sebelumnya dari hasil uji *Post-Hoc* dan *Mann-Whitney*. Interpretasi hasil uji korelasi didasarkan pada nilai p. Jika $p < 0,05$ dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi yan bermakna antara dua variabel yang diuji. Jika arah korelasi *Pearson* didapatkan bernilai positif yang berarti searah menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara variabel yang sebanding, artinya

semakin besar nilai satu variabel, maka semakin besar pula nilai variabel lainnya. Sebaliknya pada hasil yang bernilai negatif yang berarti berlawanan arah menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang berbanding terbalik artinya semakin besar nilai satu variabel, maka semakin kecil nilai variabel lainnya (Dahlan, 2004).

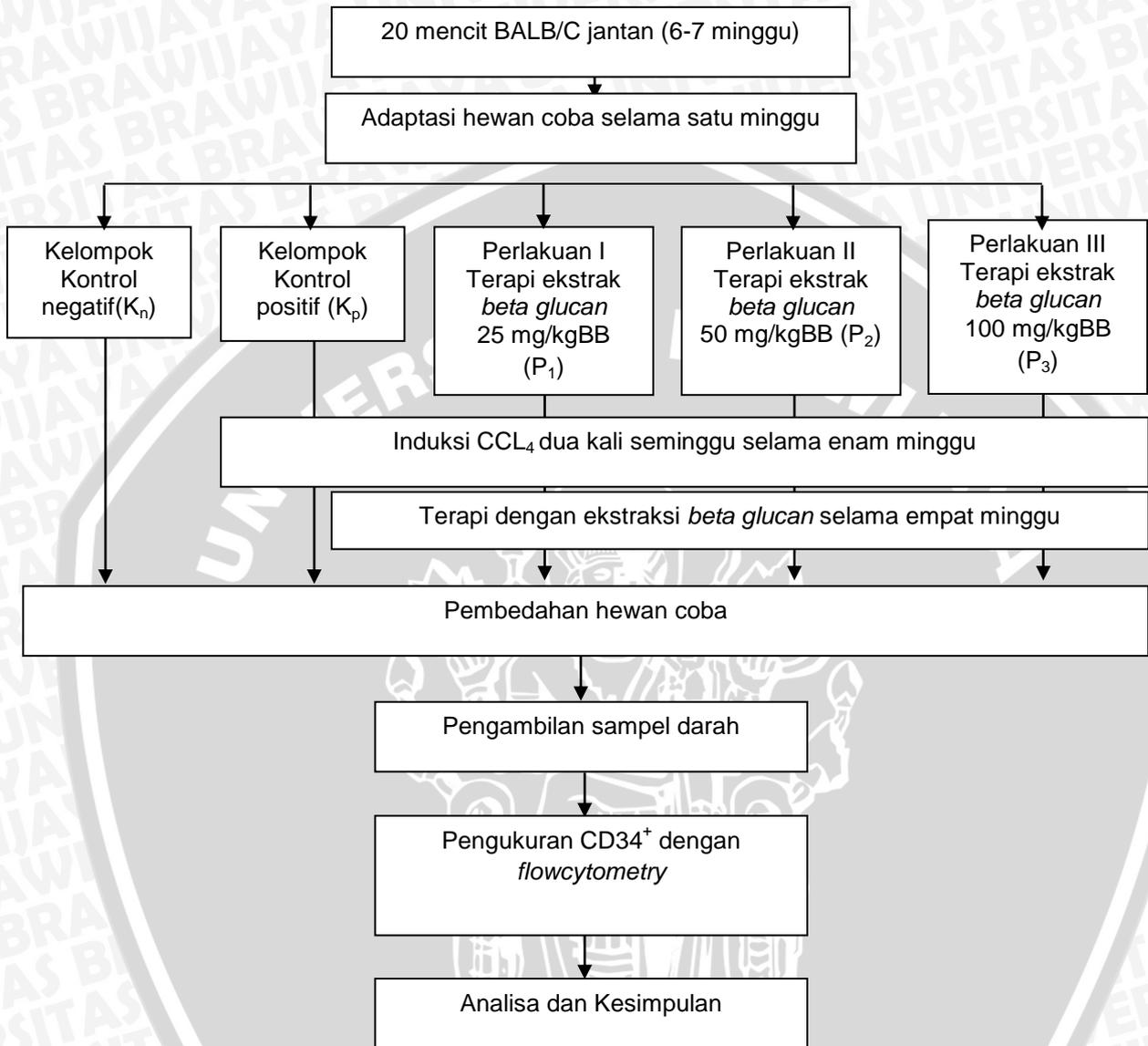
Tabel 4.1 Kekuatan Korelasi Pearson

Nilai	interpretasi
0,0 sd <0,2	Sangat lemah
0,2 sd <0,4	Lemah
0,4 sd <0,6	Sedang
0,6 sd < 0,8	Kuat
0,8 sd 1	Sangat Kuat

4.9 Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Tahap Persiapan																	
1.	Mengurus <i>ethical clearance</i> & perijinan laboratorium	■															
2.	Belanja alat dan bahan penelitian	■															
3.	Pembuatan ekstrak <i>beta glucan</i> dari <i>S. cerevisiae</i>			■													
4.	Aklimatisasi Mencit			■													
Tahap Pelaksanaan																	
1.	Induksi CCL ₄					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2.	Pemberian terapi ekstrak <i>beta glucan</i> dari <i>S. cerevisiae</i>					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3.	Pembedahan mencit																
4.	Pengukuran <i>flowcytometry</i> kadar CD34 ⁺																
5.	Pengukuran kadar SGOT SGPT																
Tahap Penyelesaian																	
1.	Analisa data																
2.	Penyusunan Laporan akhir																

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian