

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian menggunakan desain *experimental post test only control group*.

4.2 Objek dan Sampel Penelitian

4.2.1 Objek penelitian

Objek penelitian menggunakan tikus jantan jenis *Rattus Norvegicus strain Wistar*. Pemilihan objek penelitian dan pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sesuai dengan kriteria inklusi-drop out, bahan pakan dan bahan penelitian yang sama.

4.2.2 Sampel Penelitian dan Kelompok Perlakuan

4.2.2.1 Besaran Sampel

Penentuan besar objek untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, menggunakan rumus Federer (1963) dalam c yaitu: $(t-1)(r-1) \geq 15$ dimana,

t : banyaknya kelompok perlakuan,

r : jumlah pengulangan (replikasi)

pada penelitian ini $t = 8$, sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

$$(8-1)(r-1) \geq 15$$

$$7(r-1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 15 + 7$$

$$r \geq 22 / 7$$

$$r \geq 3,14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

dengan demikian, jumlah pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 4. Untuk mengantisipasi adanya tikus yang meninggal (17,5%) (Li *et al.*, 2012) tiap kelompok ditambahkan faktor koreksi sebesar 20%, sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan adalah $4 + (4 \times 20\%) = 4 + 0,8 = 4,8$ atau minimal 5.

Jadi setiap kelompok berisikan 5 tikus sehingga secara keseluruhan diperlukan $8 \times 5 = 40$ tikus.

4.2.2.2 Kriteria Inklusi

- 1) Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* berjenis kelamin jantan
- 2) Usia 2 – 3 bulan
- 3) Berat badan 280 - 300 gram
- 4) Kondisi tikus sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.2.3 Kriteria Drop Out

- 1) Tikus tidak mau makan sehingga mengganggu kesehatan
- 2) Tikus sakit atau mati selama masa perlakuan

4.2.2.4 Kelompok perlakuan

Penelitian ini menggunakan 8 kelompok seperti terlihat pada tabel dibawah ini. Injeksi CCl_4 diberikan selama 9 minggu dengan harapan menghasilkan fibrosis derajat-3 (F3). Terapi kurkumin diberikan selama 2, 5 dan 9 minggu. Pemilihan waktu 2, 5 dan 9 minggu menyesuaikan dengan pengalaman penelitian sebelumnya, dimana injeksi CCl_4 2 minggu menghasilkan derajat fibrosis F1 (ada fibrosis terbatas di area porta), injeksi CCl_4 selama 5 minggu menghasilkan derajat fibrosis F2 (fibrosis perifer di area porta, terbentuk

septum fibrosa, terjadi kerusakan arsitektur intralobular) dan injeksi CCl₄ selama 9 minggu menghasilkan derajat fibrosis F3 (terjadi septum fibrosa disertai kerusakan struktur intralobular, belum terlihat sirosis).

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan

Kelompok		Minggu																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	K-Neg	injeksi ip NaCl 1cc 2x / minggu									X								
2	K-Pos	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									X								
3	KP-2	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 2 minggu	X							
4	KK-2	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin	X							
5	KP-5	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 5 minggu		X						
6	KK-5	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin		X						
7	KP-9	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 9 minggu		X						
8	KK-9	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin		X						

Keterangan:

- K-Neg : kelompok negatif, tikus hanya diberi injeksi NaCl 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu.
- K-Pos : kelompok positif, tikus diberi injeksi CCl₄ 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu.
- KP-2 : kelompok perlakuan 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 2 minggu.
- KK-2 : kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada K-Pos dan diberi pelarut kurkumin selama 2 minggu.
- KP-5 : kelompok perlakuan 5 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 5 minggu.

- KK-5 : kelompok kontrol 5 minggu, tikus diberi injeksi CCl_4 seperti pada K-Pos dan diberi pelarut kurkumin selama 5 minggu.
- KP-9 : kelompok perlakuan 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl_4 seperti pada kelompok K-Pos dan diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 9 minggu.
- KK-9 : kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl_4 seperti pada K-Pos dan diberi pelarut kurkumin selama 9 minggu.
- Tanda *) merupakan waktu tikus dikorbankan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- 1) Injeksi CCl_4
- 2) Pemberian kurkumin

4.3.2 Variabel tergantung

Kadar MMP-2 serum

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian rencanakan dilakukan sekitar 6 bulan mulai bulan Mei sampai September 2016.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

- 1) Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus. Penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

2) Alat Pembuat Makanan Tikus

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

3) Alat Pengambil Serum (plasma)

- Seperangkat alat bedah minor (sprit, kapas, tabung reaksi, pinset, scaple, gunting), spuit 5mL, kapas, seperangkat tabung reaksi.
- Sonde untuk pemberian perlakuan beserta tube ukuran 1,5 mL dan 15 mL.

4) Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl_4

- Pipet, beaker glass, spatula, spuit

4.5.2 Bahan

- 1) Hewan coba : tikus *rattus norvegicus strain wistar* sesuai kriteria inklusi.
- 2) Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- 3) Bahan pembuatan pakan standar: Pakan standar tikus berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- 4) Bahan pembuatan larutan CCl_4 : CCl_4 , minyak jangung.
- 5) Bahan pakan paparan kurkumin
- 6) Bahan reagensia sesuai dengan penelitian ranting.
- 7) Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, ether.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Tikus model fibrosis hati : hewan coba yang dipapar dengan CCl_4 dalam waktu 9 minggu sehingga menyebabkan fibrosis hati F3.
- 2) Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus Norvegicus*) strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- 3) Injeksi CCl_4 adalah pemberian CCl_4 secara intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, 2 kali seminggu selama 9 minggu. Termasuk data nominal.
- 4) Paparan kurkumin adalah pemberian kurkumin peroral melalui sonde dengan dosis 200 mg/kgBB/hari (Fu *et al.*, 2008; Gangarapu *et al.*, 2013), setelah diinjeksi CCl_4 sebanyak 1ml/kgBB 2x seminggu selama 9 minggu. Kurkumin yang digunakan adalah kurkumin dengan kemurnian >94% yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Termasuk data nominal.
- 5) Kadar MMP-2 Serum adalah Kadar *Matrix Metalloproteinase-2* pada serum yang diukur dengan metode ELISA dengan menggunakan satuan pg/mL. Termasuk scala data rasio.

4.7 Prosedur Penelitian .

4.7.1 Prosedur Perlakuan terhadap Tikus

4.7.1.1 Persiapan Sebelum Pemeliharaan Tikus

Sebelum pemeliharaan, peneliti mempersiapkan kandang tikus sejumlah 8 buah dan memberi label pada kandang tikus sesuai dengan kelompok (K-positif, K-negatif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9 dan KK-9). Masing-masing kandang berisi 2-3 ekor tikus. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus bisa bernapas dengan ventilasi udara yang cukup.

Kandang diletakkan pada suhu ruangan 25-28°C dan kelembapan udara 50-70%. Peneliti juga menyiapkan tempat minum untuk tikus yang bersih dan dilengkapi dengan sedotan sehingga tikus bisa dengan mudah meminum air.

4.7.1.2 Pemeliharaan Tikus

- 1) Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan kondisi laboratorium selama satu minggu.
- 2) Pemeliharaan tikus dilakukan selama 9-18 minggu.
- 3) Memberikan pakan berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
- 4) Makanan dan air ditambahkan setiap hari secukupnya.
- 5) Lingkungan tempat pemeliharaan tikus dikondisikan 12 jam terang selama pukul 06.00 hingga 18.00 dan 12 jam gelap selama pukul 18.00 hingga 06.00.
- 6) Alas sekam diganti seminggu dua kali untuk menjaga kebersihan kandang dan tikus.
- 7) Pencatatan pada *logbook* dilakukan setiap kali melakukan tindakan pada hewan coba.

4.7.1.3 Perlakuan Fisik

- 1) Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti penimbangan berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida. Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan diri dengan tikus agar tikus mengetahui keberadaan orang disekitarnya dan menghindari gigitan tikus. Pengeluaran tikus dari kandang dilakukan dengan memegang ekor yang dekat di badan. Setelah ekor dipegang, tikus didekatkan ke bagian lengan tangan yang memegang

ekor tikus. Kemudian tangan yang lain, memegang tubuh bagian atas dengan posisi kaki depan tikus di antara jari telunjuk dan jari tengah peneliti. Pada saat memegang tubuh bagian atas, cengkeraman tangan peneliti tidak terlalu kencang agar tikus dapat bernafas. Kemudian, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- 2) Berat badan tikus ditimbang dan dicatat di awal percobaan untuk memastikan tikus sesuai dengan kriteria inklusi berat badan 280-300 gram.
- 3) Seminggu setelah adaptasi, induksi fibrosis hati dilakukan kepada pada kelompok K-positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9 dan KK-9, dengan injeksi karbon tetraklorida dosis 1 ml/kg berat badan secara intraperitoneal. Berat badan tikus ditimbang sebelum induksi fibrosis hati untuk menentukan dosis karbon tetraklorida yang akan diberikan. Injeksi diberikan dua kali seminggu.
- 4) Injeksi karbon tetraklorida dilakukan setelah tikus dianestesi dengan isofluran. Setelah tikus dibius, karbon tetraklorida disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital. Pada saat injeksi, posisi kepala tikus berada di bagian bawah agar organ-organ juga merosot. serta memastikan tidak ada udara dalam spuit yang dapat menyebabkan emboli.
- 5) Kurkumin diberikan ke kelompok KP-2, KP-5 dan KP-9, dengan sonde setiap hari dengan dosis 200 mg/kgbb/hari selama 2, 5 dan 9 minggu.

4.7.1.4 Perlakuan Perilaku

- 1) Tikus galur wistar tidak terlalu agresif dan mudah ketika diberi perlakuan. Pada percobaan, tikus diperlakukan dengan baik dan hati-hati agar tikus menjadi jinak. Perlakuan secara berulang setiap hari membuat tikus jinak dan terhindar dari stres.
- 2) Perlakuan terhadap tikus seperti, pengukuran berat badan dan pemberian karbon tetraklorida dilakukan pada pagi hari pukul 10 karena tikus binatang yang aktif ketika malam hari hingga pagi hari.
- 3) Pembedahan

Pembedahan dilakukan setelah tikus dikorbankan dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB. Teknik pembedahan dilakukan menurut prosedur tetap pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah :

- a. Tikus di korbakan dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB.
- b. Tikus diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
- c. Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
- d. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok.
- e. Bila perlu , bulu tikus dicukur pada bagaian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air.
- f. Darah diambil dari jantung dengan menggunakan spuit 5 cc.
- g. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
- h. Setelah dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan dengan sabun.

4) Rasa nyeri

- a. Nyeri akan timbul akibat injeksi karbon tetraklorida melalui intraperitoneal. Oleh sebab itu, sebelum injeksi tikus diinhalasi isofluran yang dilakukan hingga kecepatan pernafasan tikus melambat dan kesadaran menurun. Kemudian inhalasi dihentikan dan tikus diinjeksikan karbon tetraklorida secara intraperitoneal. Tikus yang telah diinjeksikan dimasukkan kembali ke kandang.
- b. Nyeri akan timbul setelah efek anestesi hilang. Oleh karena itu, manajemen nyeri diperlukan untuk mengurangi ketidaknyamanan selama percobaan. Menurut *Guidelines for Assessment and Management of Pain in Rodent and Rabbit*, nyeri akibat injeksi termasuk kategori ringan yang diatasi dengan terapi non farmakologi dengan mengurangi stres pada tikus melalui standar laboratorium seperti suhu ruangan yang sesuai, makanan dan air tercukupi dan mudah diakses oleh hewan coba. Keberhasilan dalam mengatasi nyeri dinilai dari aktivitas hewan, kebiasaan hewan seperti mengeliat, asupan makanan, air dan agresivitas saat diberikan perlakuan.

4.7.1.5 Bahaya Potensial

- 1) Perlakuan terhadap hewan seperti penyuntikan karbon tetraklorida dapat menimbulkan stres pada tikus. Untuk itu dilakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
- 2) Infeksi yang dapat terjadi akibat penyuntikan karbon tetraklorida secara terus menerus dapat dicegah dengan pemberian alkohol sebelum

injeksi dan jarum yang digunakan baru dan steril untuk masing-masing tikus.

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 5 mL CCl₄ dan 5mL minyak jagung dengan konsentrasi 50%, kemudian mengaduknya hingga tercampur rata.

4.7.3. Pembuatan Larutan Kurkumin

Kurkumin yang digunakan adalah Kurkumin (kemurnian >94%) yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A. dengan pelarut CMC Na 1%. Untuk membuat suspensi kurkumin, pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1% sebanyak 1mL. (Purwanti E., *et al.* 2009). Perlakuan dengan diberikan secara oral melalui sonde dengan dosis 200 mg/kgBB/hari.

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan darah

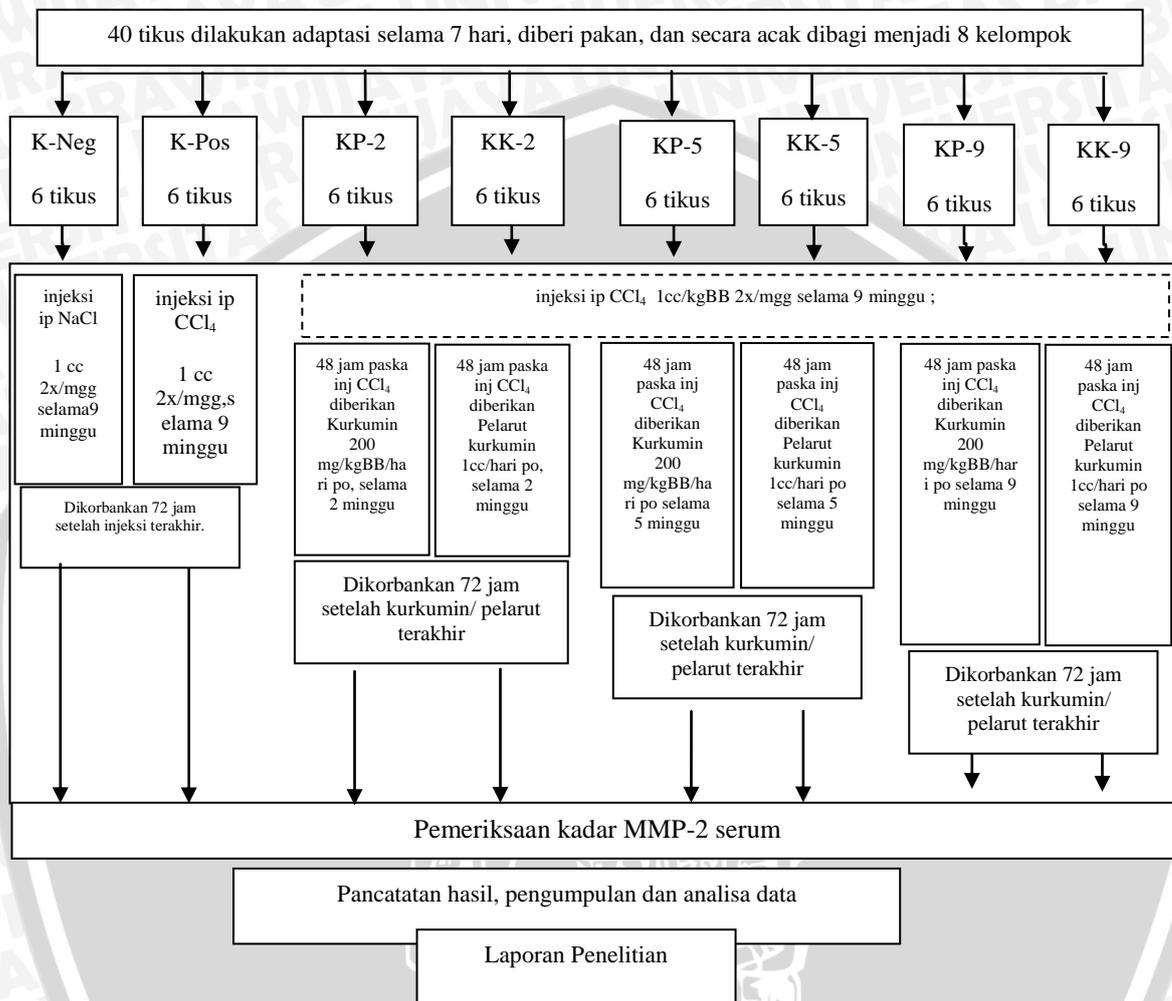
- 1) Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
- 2) Sebelum pembedahan, tikus dianastesi terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB.
- 3) Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan *stereofoam*. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas *stereofoam*.
- 4) Torak dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ dalam rongga abdomen terlihat.

- 5) Dilakukan pengambilan darah tikus yang diambil dari ventrikel jantung dengan menggunakan jarum suntik.
- 6) Darah diambil 5 mL lalu dimasukkan dalam tabung *ependorf* dan ditimbang hingga bobot darah yang dimasukkan dalam *sentrifuge* seragam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit.
- 7) Tikus dikuburkan di dalam satu lubang sejauh setengah meter, dikerjakan oleh pihak laboratorium faal.

4.7.5 Pengukuran Kadar MMP-2 Serum

Pengukuran kadar MMP-2 serum dilakukan dengan menggunakan Rat MMP-2 Platinum ELISA BMS635/BMS635TEN kit dengan prosedur sesuai dengan ketentuan *reagent* dan penggunaan dari eBioscience dengan hasil akhir menggunakan satuan pg/ml. Pembacaan hasil menggunakan ELISA *reader*.

4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Analisa Statistik

Hasil perhitungan kadar MMP-2 serum dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 15 untuk Windows 7 dengan tingkat signifikan 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha= 0,05$).

Jika uji normaitas data menunjukkan bahwa sebaran data peneitian ini normal ($p>0,05$), maka dilanjutkan dengan uji homogenitas varian, jika uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian

yang homogen ($p > 0,05$), maka analisa dapat dilanjutkan dengan Uji *one way ANOVA*. Apabila uji *One-way ANOVA* didapatkan ada perbedaan nilai rata-rata kadar MMP-2 serum $p < 0,05$, maka analisa data dapat dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*, uji *Post Hoc* dengan menggunakan uji *Tuckey HSD* dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$).

