

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan pengembangan dari pohon penelitian “Peran curcuma pada fibrogenesis tikus *wistar rattus norvegicus* yang dipapar dengan CCl_4 ”. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan analisis pada akhir perlakuan (*post test group design*) yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Hewan coba dibagi dalam 8 kelompok dan diberi perlakuan, sbb:

Tabel 4.1 Perlakuan pada hewan coba

Kelompok	Nama Kelompok	Perlakuan	
		Injeksi CCl_4	Kurkumin 200 mg/kgBB/hari
1	K - Negatif	Tanpa Injeksi CCl_4	Tanpa diberi kurkumin
2	K - Positif	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Tanpa diberi kurkumin
3	KP - 2	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi kurkumin selama 2 minggu
4	KP - 5	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi kurkumin selama 5 minggu
5	KP - 9	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi kurkumin selama 9 minggu
6	KK - 2	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi larutan CMC Na 1% selama 2 minggu
7	KK - 5	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi larutan CMC Na 1% selama 5 minggu
8	KK - 9	Injeksi CCl_4 , 9 minggu	Diberi larutan CMC Na 1% selama 9 minggu

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi secara acak menjadi 8 kelompok, semua tikus diadaptasi (*acclimatized*) selama 7 hari. Tikus dalam kelompok kontrol negatif (K-negatif) tanpa diberikan injeksi CCl_4 tapi diberi injeksi NaCl dan tikus dalam kelompok kontrol positif (K-positif) dan kelompok perlakuan (K-p2 sampai K-p9) diberikan injeksi CCl_4 intraperitoneal (ip) dengan dosis 1 mg/kgBB, 2 kali per minggu selama 9 minggu. Menurut Li dkk, proses fibrogenesis

mencapai puncak pada 48 jam paska injeksi CCl_4 dan resolusi fibrosis (fibrolisis) terjadi 72 jam setelah proses fibrogenesis maksimal (Li et al., 2012), oleh karena itu curcumin diberikan pada 48 jam paska injeksi CCl_4 . Dosis curcumin diberikan sebesar 200 mg/kgBB/hari selama sesuai kelompok perlakuan. (Fu et al., 2008). Semua tikus dikorbankan (*sacrificed*) $48+72=120$ jam (5 hari) paska perlakuan sesuai kelompok masing-masing.

Pengambilan sampel jaringan hati digunakan untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis serta untuk memeriksa ekspresi IL – 17 jaringan hati. Derajat fibrosis diperiksa dengan kriteria *Metavir Score* (Bedossa dan Poynard, 1996).

4.2 Sampel

4.2.1 Sampel

Sampel penelitian menggunakan tikus jantan jenis *Rattus Norvegicus strain Wistar*. Pemilihan sampel penelitian dan pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) sesuai dengan kriteria inklusi-eksklusi, bahan pakan dan bahan penelitian yang sama.

4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel

Penentuan besar sample untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, menggunakan rumus Federer (1963) dalam Supranto J (2000), yaitu :

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

dimana, t : banyaknya kelompok perlakuan,

r : jumlah pengulangan (replikasi)

pada penelitian ini $t = 7$, sehingga didapatkan pengulangan sebesar

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

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

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$r \geq 21/6$$

$$r \geq 3,5 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

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. Pada penelitian ini kami tetapkan jumlah sampel pada setiap kelompok sebanyak 5 tikus. Jadi secara keseluruhan diperlukan $8 \times 5 = 40$ tikus.

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* berjenis kelamin jantan
- b. Usia 2 – 3 bulan
- c. Berat badan 280 - 300 gram
- d. Kondisi tikus sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi (*Drop Out*)

- a. Tikus tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian
- b. Tikus sakit atau mati selama masa perlakuan

4.2.4 Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan 8 kelompok seperti terlihat pada tabel dibawah ini. Injeksi CCl₄ diberikan selama 9 minggu dengan harapan menghasilkan fibrosis hati hati 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 CCl₄ selama 2 minggu menghasilkan derajat fibrosis F1. Injeksi CCl₄ selama 5 minggu menghasilkan derajat fibrosis F2 dan injeksi CCl₄ selama 9 minggu menghasilkan derajat fibrosis F3.

Tabel 4.2 Daftar dan Deskripsi 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 2x / minggu								X									
3	KP-2	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan curcumin		X							
4	KK-2	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan CMC Na 1 %		X							
5	KP-5	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan curcumin					X				
6	KK-5	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan CMC Na 1%					X				
7	KP-9	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan curcumin									X
8	KK-9	Injeksi ip CCL ₄ 1cc 2x / minggu								Diberikan larutan CMC Na 1 %									X

Keterangan Tabel 4.2:

- 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 larutan curcumin 200 mg/kg BB selama 2 minggu.
 KK-2 : Kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberi injeksi CCL₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi larutan CMC Na 1 % selama 2 minggu.
 KP-5 : Kelompok perlakuan 5 minggu, tikus diberi injeksi CCL₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi larutan curcumin 200 mg/kg BB selama 5 minggu.
 KK-5 : Kelompok kontrol 5 minggu, tikus diberi injeksi CCL₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi larutan CMC Na 1 % selama 5 minggu.
 KP-9 : Kelompok perlakuan 9 minggu, tikus diberi injeksi CCL₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi larutan curcumin 200 mg/kg BB selama 9 minggu.
 KK-9 : Kelompok kontrol 9 minggu, tikus diberi injeksi CCL₄ seperti pada kelompok K-Pos dan diberi larutan CMC Na 1 % selama 9 minggu.

*Tanda X tikus dikorbankan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independent)

Ekspresi IL – 17 di Jaringan Hati

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependent)

Derajat Fibrosis Hati

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih jantan strain wistar, pemberian CCl₄, kandang tikus, makanan, dan minuman tikus

4.3.4 Variabel Perancu

Sitokin Pro – Inflamasi lainnya

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

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

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

a. 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.

b. Alat Pembuat Makanan Tikus

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

c. Alat Pengambil Serum (plasma)

Seperangkat alat bedah minor (spuit, kapas, tabung reaksi, pinset, scaple, gunting), spuit 5mL, kapas, seperangkat tabung reaksi.

d. Sonde untuk pemberian perlakuan beserta tube ukuran 1,5 mL dan 15 mL.

e. Alat Pemeriksaan Patologi Anatomi

Rotari mikrotom merek LEICA, mikroskop cahaya merek Nikon Eclipse C 600, dengan kamera Nikon digital Net Camera DN 100 dengan pembesaran 40X, 100X, dan 200X, disertai lensa okuler 10X dan lensa obyektif 100X, kaca obyek dan kaca penutup.

f. Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl₄

Pipet, beaker glass, spatula,spuit.

4.5.2 Bahan

a. Hewan coba : tikus *rattus norvegicus strain winstar* sesuai kriteria inklusi.

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

- c. Bahan pembuatan pakan standar: Pakan standar tikus berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- d. Bahan pembuatan larutan CCl₄ : CCl₄, minyak jangung.
- e. Bahan pakan paparan curcumin
- f. Bahan reagensia sesuai dengan penelitian ranting.
- g. Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, ether.
- h. Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10% , aceton, xylol, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, Pewarnaan H&E, alkohol 95%, air, hematoxilin, lithium karbonat

4.6 Definisi Operasional

- a. 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 230-280 gram.
- b. Ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati adalah hasil analisa dengan metode imunohistokimia dengan menghitung rata-rata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 pada jaringan hati, dalam 10 lapang pandang dan dianalisa dengan mikroskop pembesaran 400x. Sel limfosit biasanya terdapat di area periportal, di area fibrosis, dan di sinusoid (Wang et al., 2011). Hasil data berupa data rasio.

- c. Induksi 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 Kontrol, dengan lama pemaparan sesuai dengan derajat fibrosis yang akan dicapai
- d. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- e. Derajat fibrosis hati diamati dan dinilai dengan kriteria Metavir Score (Bedossa dan Poynard, 1996) dimana:
 - F0: Tidak ada fibrosis
 - F1: Fibrosis portal tanpa septa
 - F2: Fibrosis portal dengan beberapa septa
 - F3: Beberapa septa dengan sirosis
 - F4: SirosisHasil data yang didapatkan berupa data ordinal
- f. Paparan curcumin adalah pemberian curcumin peroral dengan dosis 200mg/kgBB/hari (Fu *et al.*, 2008) (Gangarapu *et al.*, 2013). Curcumin yang digunakan adalah curcumin (kemurnian 95%) yang dibeli dari Sigma (St, Louis, MO, U.S.A.) (Zheng dan Chen, 2004).

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Perlakuan Terhadap Tikus

- a. Persiapan sebelum pemeliharaan tikus

Sebelum pemeliharaan, peneliti mempersiapkan kandang tikus sejumlah 8 buah dan memberi label pada kandang tikus sesuai dengan kelompok perlakuan (K-negatif, K-postif, K-p2, K-p5, K-

p9, K-k2, K-k5 K-k9). Masing – masing kandang berisikan 5 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.

b. Pemeliharaan tikus

- Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan kondisi laboratorium selama satu minggu.
- Pemeliharaan tikus dilakukan selama 2-15 minggu.
- Memberikan pakan berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
- Makanan dan air ditambahkan setiap hari secukupnya.
- 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.
- Alas sekam diganti seminggu dua kali untuk menjaga kebersihan kandang dan tikus.
- Pencatatan pada logbook dilakukan setiap kali melakukan tindakan pada hewan coba.

c. Perlakuan fisik

- Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti penimbangan berat badan dan induksi fibrosis hati

dengan karbon tetraklorida. Sebelum memegang tikus, peneliti mendekati 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 vertical.

- Berat badan tikus ditimbang dan dicatat di awal percobaan untuk memastikan tikus sesuai dengan kriteria inklusi berat badan 280-300 g.
- Seminggu setelah adaptasi, induksi fibrosis hati dilakukan kepada pada semua kelompo kecuali kelompok K-Negatif 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.
- 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.

d. Perlakuan Perilaku

- 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 stress
- Perlakuan terhadap tikus seperti, pengukuran berat badan dan pemberian karbontetraklorida dilakukan pada pagi hari pukul 10 karena tikus binatang yang aktif ketika malam hari hingga pagi hari.

e. Pembedahan

Pembedahan dilakukan setelah euthanasia dengan inhalasi gas eter. Teknik pembedahan dilakukan menurut Prosedur tetap Pembedahan Hewan Uji dengan langkah-langkah :

- Tikus di euthanasia dengan inhalasi eter
- Tikus diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
- Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan

- Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok
- Bila perlu, bulu tikus dicukur pada bagian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air
- Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus (organ yang diambil adalah darah, hepar, otak, esofagus-gaster-intestin, paru, limpa dan ginjal)
- Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan
- Organ dicuci dengan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah
- Organ kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% berulang-ulang
- Organ ditiriskan diatas kertas saring
- Setelah air berkurang, organ ditempatkan pada cawan petri kering kemudian di timbang
- Bobot masing-masing organ dicatat
- Organ yang telah ditimbang kemudian dimasukkan dalam pot berisi formalin 4% dan buffer formalin
- Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
- Setelah dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan dengan sabun.

f. Rasa nyeri

- Nyeri akan timbul akibat injeksi karbontetraklorida 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 karbontetraklorida intraperitoneal. Tikus yang telah diinjeksikan dimasukkan kembali ke kandang.
- 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 nonfarmakologi 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.
- g. Tindakan mematikan/mengorbankan hewan

Euthanasia dilakukan setelah pemberian suplemen ALA tiga minggu berdasarkan salah satu metode euthanasia yang dicantumkan dalam *AVM Guidelines on Euthanasia (2007)* yaitu dengan inhalasi eter. Inhalasi eter dapat mendepresi langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang

menyebabkan hipoksia. Inhalasi eter dilakukan dengan memasukkan kedalam tabung berisi eter dan kemudian ditutup. Tikus di tunggu hingga tidak bergerak, kemudian kematian dipastikan dengan memeriksa tanda-tanda vital. Metode Euthanasia menggunakan inhalasi eter karena efek depresan cepat dan mudah dilakukan dengan menggunakan wadah tertutup.

h. Bahaya potensial yang dapat terjadi selama pemeliharaan dan cara pencegahan yang dilakukan.

- Perlakuan terhadap hewan seperti penyuntikan karbontetraklorida dapat menimbulkan stres pada tikus. Untuk itu dilakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
- Infeksi yang dapat terjadi akibat penyuntikan karbontetraklorida 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 CCl_4

- a. Mengambil CCl_4 dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari.
- b. Melarutkan CCl_4 dengan minyak jagung sebanyak 1:1 didalam beaker glass, yaitu 5 mL CCl_4 dan 5mL minyak jagung dengan konsentrasi 50%, kemudian mengaduknya hingga tercampur rata.

4.7.3 Pembuatan Larutan Kurkumin

Kurkumin yang digunakan adalah (kemurnian >94%) yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A. dengan pelarut CMC Na (Sodium Carboxyl Methyl Cellulose) 1%. Untuk membuat suspensi, pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1% sebanyak 1 mL. Perlakuan dengan diberikan secara oral melalui sonde dengan dosis 200mg/kgBB/hari.

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

- a. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
- b. Sebelum pembedahan, tikus dianastesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi.
- c. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
- d. Toraks 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.
- e. Dilakukan pengambilan hati tikus

4.7.5 Persiapan Hati Sebelum Di Periksa

- a. Fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dengan ketebalan 4-5 mm. Jaringan

ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk identifikasi. Fiksasi bertujuan 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.

- b. *Embedding*. Potongan jaringan hati direndam ke dalam acetone 4x1 jam. Selanjutnya potongan jaringan hati direndam ke dalam xylol selama 4x1 jam. Setelah itu, potongan jaringan hati direndam ke dalam parafin cair (suhu 60°C) selama 4x1 jam. Terakhir, potongan jaringan hati direndam ke dalam parafin blok selama 24 jam.
- c. *Penyayatan*. Potongan jaringan hati disayat dengan mikrotom *rotatory/ sliding* dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan diletakkan pada *water bath* (suhu 60°C). Sayatan diletakkan pada obyek glass yang telah terlebih dahulu diusap dengan Mayer albumin, diamkan selama 24 jam.

4.7.5.1 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

Lakukan Pewarnaan HE. Preparat dicelupkan pada xylol selama 3 x 15 menit. Preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3 x 15 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 lithium 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. (Beny) 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 hati dilakukan di bawah mikroskop. Penentuan derajat fibrosis hati menggunakan kriteria *Metavir Score* (Bedossa dan Poynard, 1996) dimana:

- F0: Tidak ada fibrosis
- F1: Fibrosis portal tanpa septa
- F2: Fibrosis portal dengan beberapa septa
- F3: Beberapa septa dengan sirosis
- F4: Sirosis

4.7.5.2 Pengukuran Ekspresi IL – 17 Jaringan Hati

Pengukuran ekspresi IL-17 jaringan hati dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Metode Immunohistokimia dilakukan sesuai dengan petunjuk yang

diberikan oleh pabrik. Kit imunohistokimia yang digunakan adalah Novolink Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K LOT 6027995 dari Leica Biosystem. Sebelum proses pewarnaan, setiap sediaan preparat didefaraffinisasi dengan xylene selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol 100% dan alkohol yang konsentrasinya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70% dan 60% selama masing masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan dH₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan PBS selama 5 menit.

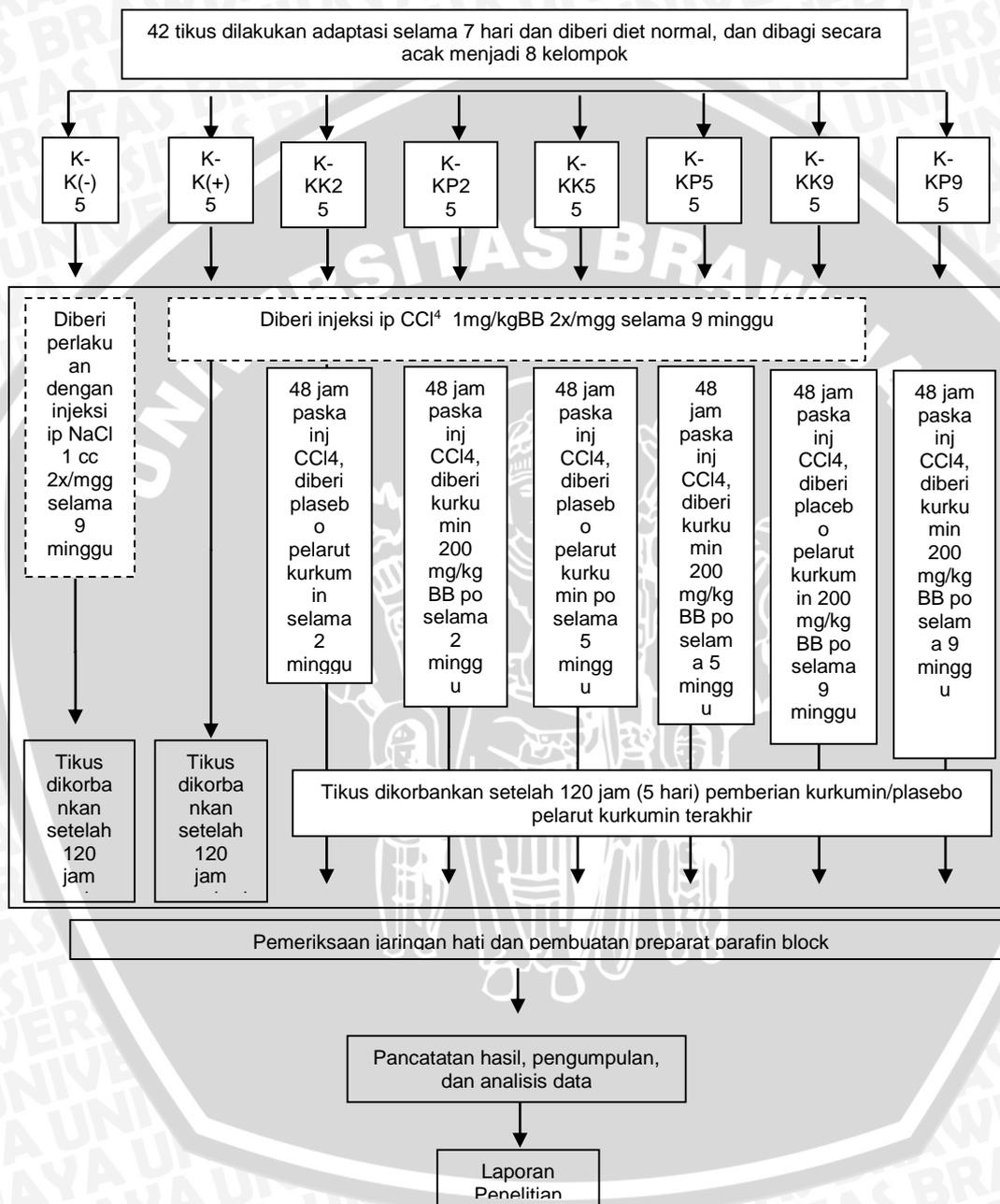
Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam glass box yang berisi citrate buffer kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit untuk dioptimalkan antigenicity-nya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan sebentar, jaringan diberi batas dengan menggunakan pap pen. Sediaan dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit.

Setelah endogenous peroksidasenya diblok, sediaan diinkubasi dengan blocking solution selama 30 menit untuk memblok avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi selama 2 jam pada suhu -4°C dengan primer antibodi yang diencerkan dengan perbandingan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH₂O

sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing masing selama 90 dan 60 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride kurang lebih 10 menit sampai didapatkan reaksi pewarnaan yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan mikroskopis. Setelah itu diwarnai lagi dengan hematoksilin untuk memperjelas inti sel selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Sediaan didehidrasi dengan menggunakan alkohol yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap dari 70%, 80%, 90% sampai 100% selama masing masing 2 menit. Setelah itu sediaan dicelupkan kedalam xylene selama 5 menit.

Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan deg glass. Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarna dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat imunostaining inti dan lebih dari 5% sel tumor positif perwarnaan. Evaluasi immunohistokimia ini akan dilakukan secara individual oleh konsulen Patologi dan peneliti untuk mendapatkan hasil yang akurat.

4.7.6 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian



4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{SD}$. Kemudian semua data dianalisis menggunakan

- *One Way ANOVA* untuk mengetahui keragaman setiap perlakuan setelah memenuhi uji normalitas dan homogenitas. Apabila tidak memenuhi uji normalitas dan homogenitas maka dilakukan uji *Kruskal – Wallis* sebagai alternatif.
- Uji *post – hoc* untuk mengetahui dan membandingkan lebih spesifik perbedaan masing – masing kelompok
- Uji korelasi dengan menggunakan Uji Korelasi Spearman untuk mengetahui hubungan antara variabel numerik dengan variabel ordinal

4.9 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut

Tabel 4.3 Format Tabel Pelaporan Hasil Perhitungan

Perlakuan	Tikus	Berat Badan Awal (gram)	Berat Badan Akhir (gram)	Mean Ekspresi TGF- β Jaringan Per Sampel (sel)	Mean Ekspresi TGF- β Jaringan Kelompok (sel)	Derajat Fibrosis Hati
K-Negatif Diinjeksi NaCl 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu						
K-Positif Diinjeksi CCl4 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu						

Perlakuan	Tikus	Berat Badan Awal (gram)	Berat Badan Akhir (gram)	Mean Ekspresi TGF- β Jaringan Per Sampel (sel)	Mean Ekspresi TGF- β Jaringan Kelompok (sel)	Derajat Fibrosis Hati
KP-2 Sonde curcumin (200mg/kgBB) selama 2 minggu						
KK-2 Sonde pelarut curcumin selama 2 minggu						
KP-5 Sonde curcumin (200mg/kgBB) selama 5 minggu						
KK-5 Sonde pelarut curcumin selama 5 minggu						
KP-9 Sonde curcumin (200mg/kgBB) selama 9 minggu						
KK-9 Sonde pelarut curcumin selama 9 minggu						