

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Biokimia dan Biomol, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) terhadap deposisi kolagen pada mencit model fibrosis hepar. Induksi CCL₄ mengacu pada dosis Sahreen *et al.*(2011) sebesar 0.5 ml/kg, dua kali seminggu selama enam minggu. Dosis ekstrak mengacu pada penelitian Domitrovic *et al.*, (2009) dengan pemberian ekstrak luteolin 10, 25, dan 50 mg/kg BB didapatkan penurunan fibrogenesis yang signifikan. Maka digunakan variasi dosis 15, 30, dan 60 mg/kgBB selama lima minggu diawali pada minggu ke-2 penelitian.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Biokimia dan Biomol, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Faal Universitas Brawijaya Malang

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur dan telah dilakukan determinasi. Sedangkan mencit galur BALB/c jantan berusia 6 minggu diperoleh dari UGM, Jogjakarta dengan berat 20-25 g

4.4 Penentuan jumlah sampel

Sampel penelitian adalah model mencit BALB/c jantan berusia 6-7 minggu jantan sesuai penelitian Jong In Yang dan rekannya (2009). Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

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

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

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

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dibesarkan menjadi 5 pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit kacang tanah yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (mencit yang tidak diberikan CCL₄ dan tanpa diberikan ekstrak kulit kacang tanah)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (mencit yang diberikan CCL₄ tanpa diberikan ekstrak kulit kacang tanah)

3. Kelompok 3: mencit yang diberikan CCL_4 dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi I (15mg/Kg BB)
4. Kelompok 4: mencit yang diberikan diberikan CCL_4 dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi II (30mg/Kg BB)
5. Kelompok 4: mencit yang diberikan diberikan CCL_4 dan ekstrak kulit kacang tanah konsentrasi III (60 mg/Kg BB)

4.5.2 Variabel tergantung

- Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah deposisi kolagen hepar

4.6 Definisi Operasional

- a. Kulit kacang tanah (*Arachis hypogea L*) didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur dan sebelumnya telah dilakukan determinasi.
- b. Hewan coba: mencit galur BALB/c jantan berusia 6 minggu karena galur ini mampu memperagakan status imunitas manusia. Mencit diperoleh dari Universitas Gajah Mada dengan berat 20-25 g
- c. CCL_4 (SIGMA) didapat dari lab farmakologi. Merupakan zat yang mampu menginduksi fibrosis dan sirosis (Domitrović, 2009).
- d. Ekstrak kulit kacang tanah adalah kadar atau konsentrasi dari kulit kacang tanah yang dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan ethanol 96%
- e. Masson Trichome adalah teknik pengecatan histologis untuk melihat deposisi kolagen pada jaringan.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Ekstraksi

4.7.1.1 Alat

1. kertas saring
2. gelas ekstraksi
3. neraca analitik
4. alat pemanas air
5. labu penampung hasil evaporator
6. *rotary evaporator*
7. tabung pendingin
8. alat pompa sirkulasi air dingin
9. bak penampung air dingin
10. pipa plastik
11. pompa vakum
12. tabung penampung etanol
13. batu didih
14. cawan penguap
15. oven

4.7.1.2 Bahan

1. kulit kacang tanah
2. ethanol 96%
3. aquades

4.7.2 Pengecatan Masson Trichome

1. Kit Masson Trichome
2. pipet

3. *Multichannel pipette*
4. PBS
5. BSA 1%
6. Tissue
7. Sarung tangan
8. Masker

4.7.2.2 Bahan

1. Jaringan hepar

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan pemeliharaan tikus, pembuatan diet normal, ekstraksi kulit kacang tanah, induksi CCL4, pembedahan,

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Kacang Tanah

Proses ekstraksi:

- a. Sampel serbuk kulit kacang tanah (100 g).
- b. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- c. Kemudian masukkan 300 ml etanol 96%
- d. Terus direndam selama 48 jam hingga mengendap.
- e. Rendaman disaring menggunakan kertas saring
- f. Ampas direndam lagi dengan pelarut etanol 70 % selama 24 jam
- g. Rendaman disaring kembali menggunakan kertas saring

Proses Evaporasi:

- a. Diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif kulit kacang tanah yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- d. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
- e. Larutan etanol 96% dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f. Ditunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu).
- g. Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik.
- h. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan masukkan dalam freezer.

4.8.2 Perawatan Mencit

Pemeliharaan hewan coba dilakukan dengan menyediakan mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *comfeed*, alkohol 70%. Mencit diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama tujuh hari dan dibagi enam kelompok.

4.8.3 Pembuatan diet normal

Diet normal merupakan diet yang diberikan untuk kelompok A (kontrol negatif). Diet normal merupakan asupan normal tikus yang dibuat dengan mencampur bahan-bahandengan komposisi PAR-S 25,6 gram,tepung terigu 14 gram, dan air 0,4 gram. Semua bahan dicampur di dalam baskom.Setelah itu, ditimbang dan dibulatkan dengan berat 40 gram untuk satu tikus. Makanan diberikan 40 gram/tikus tiap harinya. Diet diberikan selama 60 hari. Sisa makanan hari sebelumnya juga ditimbang tiap harinya untuk mengetahui rerata asupan makanan setiap tikus.

4.8.4 Induksi CCL4

CCL₄ dilarutkan dalam minyak mineral saat akan digunakan. Mencit Balb/c dipuasakan semalam, lalu diinjeksikan CCL₄ intraperitoneal dua kali seminggu selama enam minggu (Yang, 2009).

4.8.5 Pembedahan Mencit

Sebelum dibedah mencit dianestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh mencit yang sudah diberi anestesi di atas steroform, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Ambil darahnya terlebih dahulu dengan spuit 1 ml melalui jantung. Setelah itu, ambil organ heparnya dan fiksasi ke dalam formalin 10%.

4.8.6 Pewarnaan Masson Trichome

Jaringan hepar dipotong dalam bentuk paraffin setebal 5 µm. Lalu dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi dengan alkohol 100%, 95%, dan 70%. Kemudian dibilas aquades dan dilanjutkan dengan *Weigert's iron*

hematoxylin working solution 10 menit. Kemudian bilas air hangat 10 menit dilanjutkan aquades. Setelah itu, diberi *Biebrich scarlet-acid fuchsin solution* 10-15 menit lalu bilas. Diferensisasikan dalam *phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution* selama 10-15 menit. Kemudian pindahkan potongan langsung pada aniline blue solution dan diwarnai 5-10 menit. Selanjutnya, cuci cepat dan beri larutan asam asetat 1% 2-5 menit dan cuci dengan aquades. Terakhir, dehidrasikan dengan cepat dengan etil alkohol 95% dan alcohol murni dan kemudian bersihkan pada *xylene*. Deposisi kolagen sebagai pertanda fibrosis akan nampak berwarna biru.

4.9 Analisis dan Pengumpulan Data

Deposisi kolagen dibandingkan secara mikroskopik.



