

BAB 4

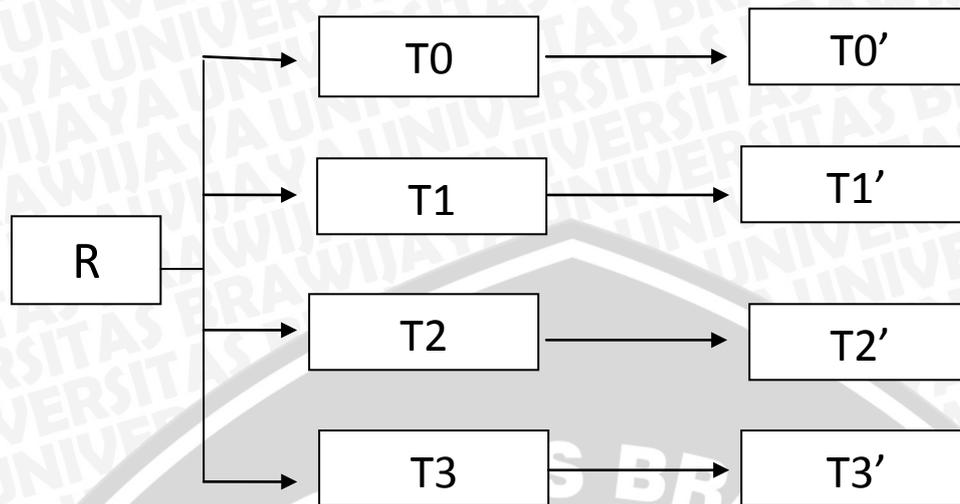
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dilakukan di laboratorium dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi dari Interleukin 17 (IL-17) serum terhadap derajat fibrosis hati pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄). Tikus akan diberikan CCl₄ dosis tertentu sesuai perhitungan berat badan sebanyak 2 kali seminggu. Kemudian dibedah dan dilihat derajat fibrosis dan ekspresi dari IL-17 serumnya, berdasarkan waktu terjadinya fibrosis hati dengan mengacu pada percobaan sebelumnya yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stages in Rats* yang menggunakan standar *Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis* yang ditetapkan pada *10th World Digestive Disease Academic Conference* sebagai standar derajat fibrosis hati.

Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari, kemudian dibagi menjadi beberapa kelompok. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih *Wistar* jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, terdiri dari T0 sebagai kontrol negatif dan diamsusikan sebagai fibrosis derajat 0, T1 yang merupakan perlakuan dengan dosis CCL 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu sebagai fibrosis derajat I, T2 yang merupakan perlakuan dengan dosis CCL 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu sebagai fibrosis derajat II, T3 yang merupakan perlakuan dengan dosis CCL 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu sebagai fibrosis derajat III.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group* yang dapat dijelaskan pada bagan berikut :



Gambar 4.1 Rancangan Percobaan Post Test Only Control Group

Keterangan :

T0 : Kelompok Kontrol Negatif yang dipapar menggunakan NaCl 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu sebagai fibrosis derajat 0 .

T1 : Kelompok Perlakuan 1 yang dipapar dengan CCl₄ 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu sebagai fibrosis derajat I.

T2 : Kelompok Perlakuan 2 yang dipapar dengan CCl₄ 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu sebagai fibrosis derajat II.

T3 : Kelompok Perlakuan 3 yang dipapar dengan CCl₄ 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu sebagai fibrosis derajat III.

T0' : Pengamatan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T0

T1' : Pegamatan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T1

T2' : Pegamatan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T2

T3' : Pegamatan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T3

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan yaitu jenis *Rattus Norvegicus* galur *Wistar* . Tikus yang digunakan berusia 2-3 bulan.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur ± 2 bulan atau 6-12 minggu dengan berat badan 230-280 gram. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen.

Penentuan besar sampel pada penelitian ini menggunakan rumus Supranto.J (2000), yaitu :

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=4

r : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq 6$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan sampel sebanyak 6 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk penelitian ini adalah sebanyak 24 ekor, dengan pembagian sebagai berikut :

KELOMPOK	MACAM DIET DAN PERLAKUAN	JUMLAH TIKUS
Kontrol Negatif (N)	Diet normal dan dipapar NaCl 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu sebagai kontrol.	6
Perlakuan T1	Diet normal dan dipapar CCL4 konsentrasi 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu.	6
Perlakuan T2	Diet normal dan dipapar CCL4 konsentrasi 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu.	6
Perlakuan T3	Diet normal dan dipapar CCL4 konsentrasi 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu.	6

Tabel 4.1 Rancangan jumlah sampel dan kelompok perlakuan

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Usia \pm 2 bulan (6-8 minggu)
- c. Berat badan 230-280 gram
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

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

4.2.3.3 Kriteria Drop Out

Tikus dinyatakan *drop out* apabila sesuai dengan kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus yang sesuai dengan ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (*Independen*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah derajat fibrosis hati yang didapat dalam jangka waktu tertentu dari pemaparan Karbon Tetraklorida (CCL₄) yang merujuk pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* oleh Li Li dkk pada tahun 2012, sehingga tikus dibagi dalam kelompok yang telah dijelaskan sebelumnya.

4.3.2 Variabel Tergantung (*Dependen*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar Interleukin-17 pada serum tikus.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl₄ yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisis kadar IL-17 serum dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran derajat fibrosis hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian ± 3 bulan yaitu Maret-Mei 2014.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

- Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang, sekam, dan penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

- Alat Pembuat Makanan Tikus

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

- Alat Pengambil Serum
Sprit 5mL, seperangkat tabung reaksi, kapas, dan alkohol.
- Alat pemeriksaan kadar IL-17 Serum
Rat IL-17 A Platinum Elisa kit dari eBioscience.
- Alat pengukuran derajat fibrosis : *mikrofon rotatory sliding, water bath*, kaca objek, mikroskop
- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl₄
Pipet, *beaker glass*, spatula, spuit 1 mL.

4.5.2 Bahan

- Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- Bahan pembuatan pakan standar:
Pakan standar tikus Wistar berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
Bahan makanan :
 - Jumlah makanan rata-rata 40g/hari untuk setiap tikus
 - Pakan normal mengandung berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
 - Pemberian diberikan secara rutin
- Bahan pembuatan dan pemberian larutan CCl₄ : CCl₄, minyak jangung, spet, kapas, alkohol.
- Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, ether.
- Bahan untuk pemeriksaan IL-17 Serum : serum tikus

- Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10% , aceton, xylol, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, Pewarnaan *Hematoxyllin Eosin*, alkohol 95%, air, hematoxilin, lithium karbonat.

4.6 Definisi Operasional

1. 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, berat 230-280 gram dan telah memenuhi kriteria inklusi, serta dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok (T0), kelompok T1, kelompok T2, dan kelompok T3.
2. Kadar Interleukin-17 serum
Kadar IL-17 serum adalah kadar IL-17 yang terdapat dalam serum darah yang didapat dari hasil analisa dengan metode sandwich Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay (ELISA), menggunakan *Rat IL-17 Platinum* ELISA kit oleh eBioscience.
3. Paparan CCl4
Induksi CCl4 yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl4 sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selain kelompok T0, dengan lama pemaparan sesuai dengan derajat fibrosis yang akan dicapai, dan berpedoman pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* oleh Li Li dkk pada tahun 2012.
4. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
5. Derajat fibrosis hati, menggunakan *criteria of Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis* dengan interpretasi sebagai

berikut : S0 = Tidak ada fibrosis, S1 = Fibrosis terlokalisasi pada areal portal tanpa septa, dengan gambaran fibrosis perisinusoidal dan intralobular fibrosis, S2 = Fibrosis pada daerah perifer area portal, dan gambaran septa yang jarang, S3 = Terbentuk nya banyak septa dengan diikuti kerusakan struktur intralobular, tanpa adanya sirosis, S4 = Sirosis hepar tahap awal. Setiap derajat fibrosis yang terjadi diberi skor untuk penilaian pada analisa hasil penelitian sebagai berikut :

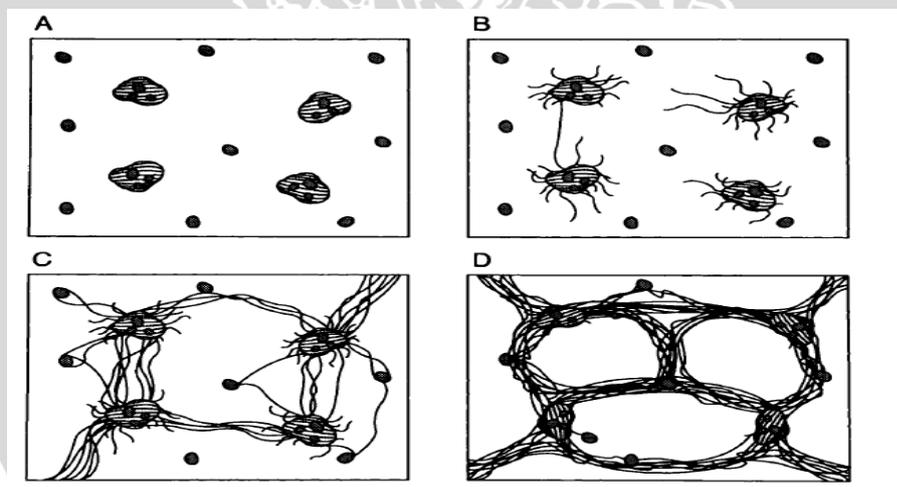
S0=Tidak ada fibrosis mendapat skor 0

S1=Fibrosis derajat 1 mendapat skor 1

S2=Fibrosis derajat 2 mendapat skor 2

S3=Fibrosis derajat 3 mendapat skor 3

Pemeriksaan Histopatologi menggunakan pewarnaan HE dan fibrosis diamati dengan mikroskop cahaya.



Gambar 4.2 Ilustrasi staging pada fibrosis hati A=S1 (fibrosis derajat 1), B=S2 (fibrosis derajat 2), C=S3 (Fibrosis derajat 3), D=S4 (sirosis hepar) (Brunt E, 1999)

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
3. Memasukkan tikus kedalam kandang yang dibuat dari bak plastik dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih jantan selama 7 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan. Pada masa adaptasi berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
4. Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol negatif, dan perlakuan dengan setiap kelompok berisi 6 tikus.
5. Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 3 hari sekali.
6. Memberikan minum dengan aquades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
7. Memberikan pakan yang berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18% yang dicampur sebanyak 40 gram untuk setiap tikus.
8. Menginduksi CCl₄ dengan disuntikkan Intraperitoneal dosis 1,0mL/KgBB 2 kali seminggu dengan lama paparan sesuai kelompok perlakuan, dan menyuntikkan NaCl dosis 1,0mL/kgBB 2 kali seminggu sebagai placebo untuk kelompok kontrol negatif.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl₄

1. Mengambil CCl₄ dengan pipet ukur sebanyak 5 mL
2. Melarutkan CCl₄ dengan minyak jagung sebanyak 1:1 didalam beaker glass, yaitu untuk CCl₄ sebanyak 5 mL dan minyak jagung 5mL dengan konsentrasi 50%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.
3. Pengambilan larutan CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/KgBB
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Menginduksi CCl₄ dilakukan 2 kali seminggu. Sebelum melakukan penyuntikan terlebih dahulu membersihkan daerah yang akan disuntik dengan kapas yang diberi alkohol dengan gerakan melingkar agar steril, dan perlu dipastikan sebelum melakukan penyuntikan tidak ada udara karena udara dapat menyebabkan emboli.

4.7.3 Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Setiap perlakuan dibedah sesuai waktu perkiraan terjadinya fibrosis hati tingkat tertentu sesuai dengan penelitian sebelumnya.
2. Tikus dianastesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ 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 disentrifuge dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit.

4.7.4 Pengukuran Kadar IL17 Serum

Pengukuran kadar IL-17 serum dilakukan menggunakan *Rat IL-17 Platinum* ELISA kit dari eBioscience dengan prosedur yang sesuai dengan ketentuan *reagent* dan penggunaan dari pabrik dan hasil akhir menggunakan satuan pg/ml. Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Tentukan jumlah *microwell* yang dibutuhkan berdasarkan banyaknya sampel yang akan diperiksa.
- Bilas *microwell* sebanyak dua kali menggunakan *Wash buffer*
- Persiapkan kadar standar yang akan digunakan, yaitu tambahkan 100 μ l *sample diluent* pada *well* standar yang kosong, lakukan dengan duplikasi, lalu tambahkan 100 μ l *standar diluent* yang telah disiapkan dari kit ELISA pada *well* yang pertama, dan encerkan standar dengan cara memindahkan 100 μ l dari satu *well* ke *well* yang lain, dan buang 100 μ l dari *well* standar terakhir.
- Tambahkan 100 μ l *sample diluent* secara duplikat ke *well* yang kosong
- Tambahkan 50 μ l *sample diluent* ke *well* untuk sampel
- Tambahkan 50 μ l sampel pada setiap *well* untuk mempersiapkan *well* untuk sampel
- Siapkan *biotin-conjugate*
- Tambahkan 50 μ l *biotin-conjugate* ke seluruh *well*
- Tutup *microwell*, kemudian inkubasikan selama dua jam pada suhu ruangan (18°C-25°C)

- Siapkan *Streptavidin-HRP*
- Setelah inkubasi 2 jam, basuk seluruh well dengan *buffer wash* sebanyak 4 kali
- Tambahkan 100 μ l *streptavidin-HRP* pada seluruh well
- Tutup *microwell*, dan inkubasikan selama 1 jam pada suhu ruangan
- Setelah inkubasi 1 jam, basuh seluruh well menggunakan *wash buffer* sebanyak 4 kali
- Tambahkan 100 μ l cairan substrat TMB pada seluruh well
- Inkubasi selama 30 menit, pada suhu ruangan
- Tambahkan 100 μ l *stop solution* pada seluruh well
- Lakukan pembacaan hasil menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

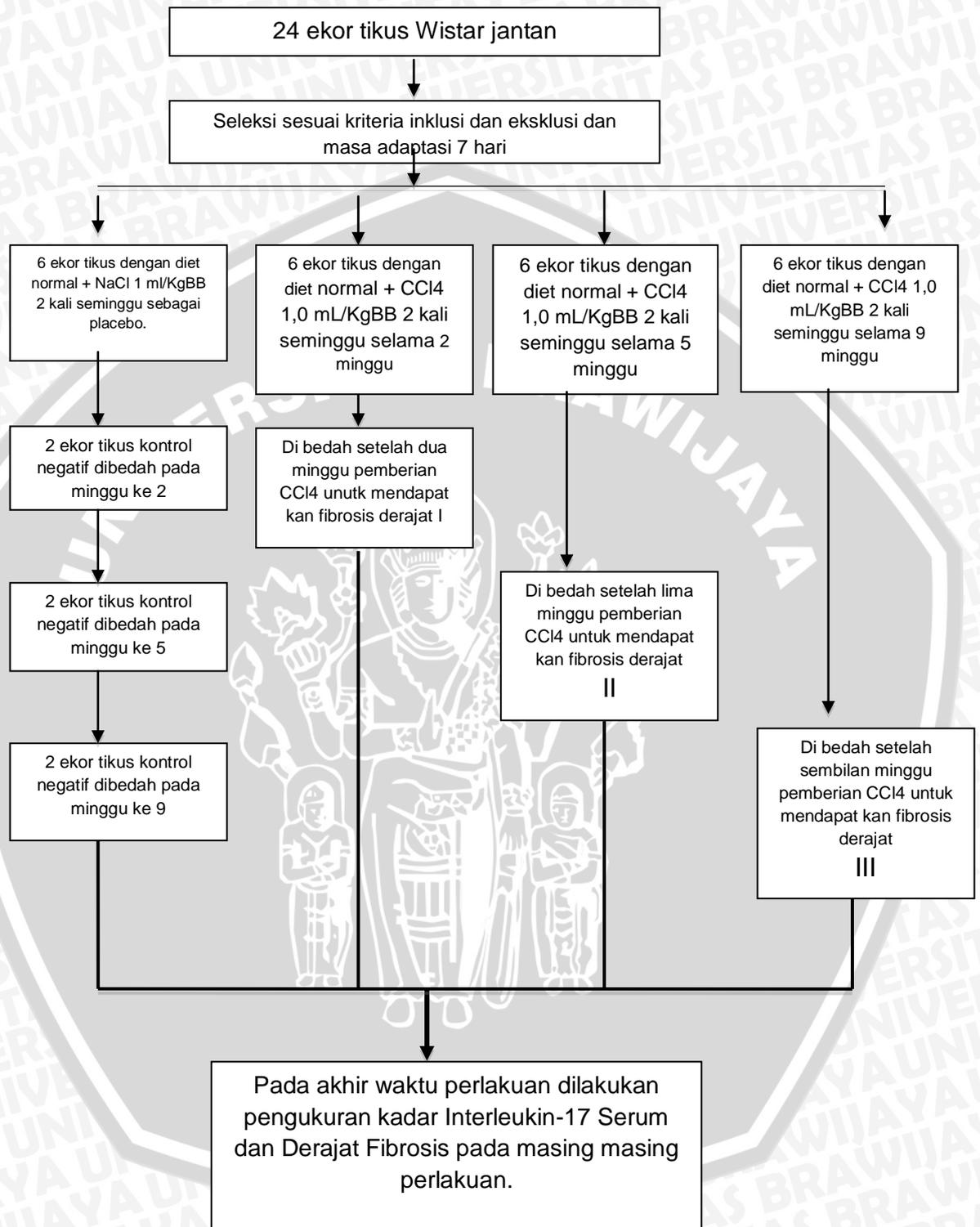
4.7.5 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

Pertama dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan daripada fiksasi adalah 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.

Kedua dilakukan embedding. Potongan jaringan hati direndam ke dalam acetone 4x1 jam. Lalu, potongan jaringan hati direndam ke dalam xylol selama 4x1 jam. Setelah itu, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin cair (suhu 60°C) selama 4x1 jam. Terakhir, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin blok selama 24 jam.

Ketiga dilanjutkan dengan penyayatan. Potongan jaringan hati disayat dengan mikron rotatory/ sliding dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan ditaruh pada water bath (suhu 60°C). Sayatan ditaruh pada obyek glass yang telah terlebih dahulu diusap dengan mayer albumin, diamankan selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan Pewarnaan Hematoxyllin Eosin. Preparat dicelupkan pada xylol selama 3 x 15 menit. Preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3 x15 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat diwarnai dengan hematoxilin 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. 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 dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

4.7.6 Bagan Alur Penelitian



4.8 Uji Analisis Data

Analisa data menggunakan SPSS 16.0 for window dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha=0,05$. Langkah-langkah uji hipotesis nya adalah sebagai berikut :



- a. Uji normalitas data untuk melihat sebaran distribusi data.
- b. Uji homegenisitas varian untuk melihat kesamaan ragam data.
- c. Uji *One way-Anova* untuk uji komparatif antara Interleukin-17 serum dan lama paparan CCl₄.
- d. *Kruskal-Wallis test* untuk uji komparatif antara derajat fibrosis hati dan lama paparan CCl₄.
- e. Uji Korelasi untuk uji korelatif (hubungan) antara derajat fibrosis hati dan kadar IL-17 serum.

