

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

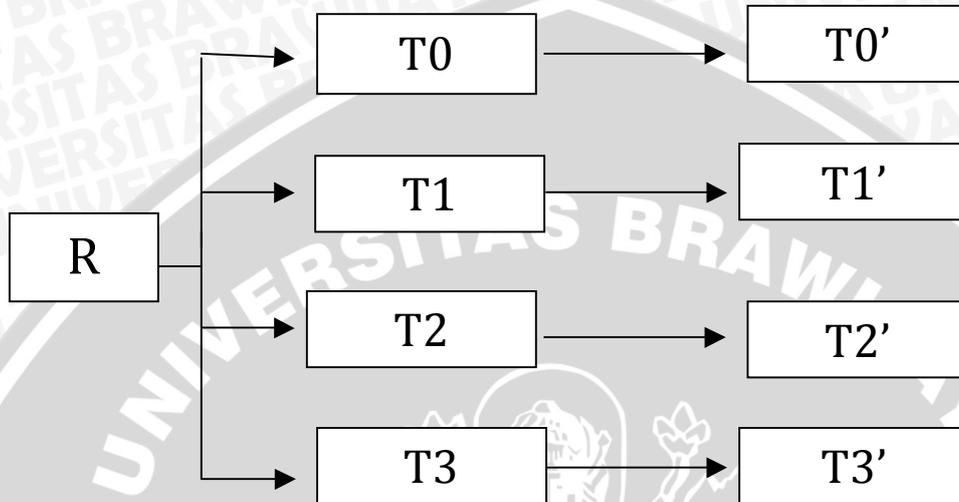
## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan ekspresi dari Interleukin 17 (IL-17) jaringan dan kadar IL-17 serum terhadap derajat fibrosis hati pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) setiap 72 jam. Setelah diinduksi CCl<sub>4</sub>, akan dilakukan pengukuran ekspresi IL-17 jaringan, kadar IL-17 serum, dan derajat fibrosis pada kelompok tikus, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, pada tiap rentang waktu fibrosis.

Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus putih *Wistar* jantan yang dibagi kedalam 4 kelompok secara acak, terdiri dari T0 (kontrol negatif), dan T1, T2, T3 yang merupakan kelompok perlakuan dengan CCl<sub>4</sub> 1,0 mL/KgBB setiap 72 jam.

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 tidak dipapar dengan CCl<sub>4</sub> 1,0mL/KgBB

T1 : Kelompok Perlakuan yang dipapar dengan CCl<sub>4</sub> 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu.

T2 : Kelompok Perlakuan yang dipapar dengan CCl<sub>4</sub> 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu

T3 : Kelompok Perlakuan yang dipapar dengan CCl<sub>4</sub> 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu

T0' : Pengamatan ekspresi IL-17 jaringan dan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T0

T1' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan dan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T1

T2' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan dan kadar IL-17 serum setelah perlakuan T2

T3' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan dan 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 yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur  $\pm 2$  bulan atau 6-8 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 sample pada penelitian ini menggunakan rumus Federrer (1963) dalam Wardhani (2007), yaitu :

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

t : jumlah perlakuan, pada penelitian ini t=4

n : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$n \geq 6$$

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 :

**Tabel 4.1** Tabel kelompok, jenis, jumlah perlakuan, dan jumlah tikus

KELOMPOK	PERLAKUAN	JUMLAH TIKUS
Kontrol Negatif (N)	Kelompok fibrosis derajat 0, tanpa paparan CCl <sub>4</sub>	6
Perlakuan T1	Kelompok fibrosis derajat 1, didapatkan dengan dipapar CCl <sub>4</sub> konsentrasi 1,0mL/KgBB setiap 72 jam selama 2 minggu	6
Perlakuan T2	Kelompok fibrosis derajat 2, didapatkan dengan dipapar CCl <sub>4</sub> konsentrasi 1,0mL/KgBB setiap 72 jam selama 5 minggu	6
Perlakuan T3	Kelompok fibrosis derajat 3, didapatkan dengan dipapar CCl <sub>4</sub> konsentrasi 1,0mL/KgBB setiap 72 jam selama 9 minggu	6

### 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 pada warna bulu tikus

#### 4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan 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

Variabel bebas atau *independent variable* pada penelitian ini adalah derajat fibrosis hati pada tikus, dengan dosis dan lama pemberian merujuk pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* (Li *et al*, 2012) sehingga dibagi dalam beberapa kelompok yang telah dijelaskan sebelumnya.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung atau *dependent variable* pada penelitian ini adalah ekspresi Interleukin-17 (IL-17) jaringan dan kadar IL-17 serum.

#### 4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih jantan strain wistar, pemberian CCl<sub>4</sub>, kandang tikus, makanan, dan minuman tikus.

#### 4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl<sub>4</sub> yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisis ekspresi IL-17 jaringan dan 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  $\pm$  2 bulan yaitu Maret-April 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, dan nampan.
- Alat Pengambil Serum  
Seperangkat alat bedah (kupas, tabung reaksi, pinset, *scaple*, gunting), spuit 5mL, dan seperangkat tabung reaksi.
- Alat pemeriksaan ekspresi IL-17 jaringan hati: kit imunohistokimia IL-17A/IL-17.
- Alat pemeriksaan kadar IL-17 Serum: Sandwich ELISA kit dari IL-17.

- Alat pengukuran derajat fibrosis : mikrofon rotatory/ sliding, water bath, dan *object glass*.
- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl<sub>4</sub>: pipet, beaker glass, spatula, dan spuit.

#### 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 40 g/hari untuk setiap tikus.
  - Pakan mormal mengandung berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
  - Pemberian diberikan secara rutin.
- Bahan pembuatan dan pemberian larutan CCl<sub>4</sub>: CCl<sub>4</sub>, minyak jangung, spet, kapas, dan alkohol.
- Bahan bedah tikus: alkohol, kapas, gunting, dan eter.
- Bahan untuk pemeriksaan ekspresi IL-17 jaringan: organ hati tikus dan kit imunohistokimia.
- Bahan untuk pemeriksaan IL-17 serum: serum tikus dan kit ELISA.
- Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10% , aseton, *xylol*, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, pewarnaan Hematoxilin Eosin (HE), 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 dan berat 230-280 gram.
2. Kadar Interleukin-17 serum  
Kadar IL-17 serum adalah jumlah IL-17 yang terdapat dalam serum darah yang didapat dari hasil analisa dengan metode sandwich *Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay* (ELISA).
3. Ekspresi Interleukin IL-17 jaringan hati  
Ekspresi IL-17 jaringan hati adalah hasil analisa dengan metode imunohistokimia dengan menghitung rata-rata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 pada jaringan hati dalam 20 lapang pandang dan dianalisa dengan mikroskop dengan pembesaran 400x.
4. Paparan karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>)  
Induksi CCL4 yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl<sub>4</sub> sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0mL/KgBB setiap 72 jam selain pada kelompok kontrol negatif 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* (Li et al., 2012).
5. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%

6. 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. Pemeriksaan histopatologi menggunakan pewarnaan HE dan fibrosis diamati dengan mikroskop cahaya.

#### **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. Tikus dimasukkan ke dalam kandang yang dibuat dari bak plastik dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih jantan selama 7 hari dengan pemberian 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. Kandang tikus diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label kontrol negatif dan perlakuan dengan setiap kelompok berisi 6 tikus.
5. Kandang diberi alas berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan sekam diganti setiap 3 hari sekali.
6. Tikus diberi minum dengan aquades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat minum diletakkan di atas kawat penutup kandang.
7. Tikus diberi pakan yang berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
8. Tikus disuntikkan CCl<sub>4</sub> intraperitoneal dosis 1,0mL/KgBB setiap 72 jam pada kelompok perlakuan.

#### 4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl<sub>4</sub>

1. CCl<sub>4</sub> diambil dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari.
2. CCl<sub>4</sub> dilarutkan dengan minyak jagung sebanyak 1:9 di dalam *beaker glass*, yaitu untuk CCl<sub>4</sub> sebanyak 5 mL dan minyak jagung 45mL dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.
3. Pengambilan larutan CCl<sub>4</sub> dengan dosis 1,0 mL/KgBB.
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Penginduksian CCl<sub>4</sub> dilakukan setiap 72 jam. Sebelum melakukan penyuntikan, terlebih dahulu daerah yang akan disuntik dibersihkan 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. Pada setiap rentang waktu derajat fibrosis, 6 tikus dari setiap kelompok dibedah untuk diperiksa derajat fibrosis, ekspresi IL-17 jaringan, dan kadar IL-17 serum.
2. Tikus dianestesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja keras yang dialasi dengan sterfoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas sterfoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral, sehingga organ-organ dalam rongga abdomen terlihat.

#### 4.7.4 Pengukuran Kadar IL-17 Serum

Pengukuran kadar IL-17 serum dilakukan dengan menggunakan Rat IL-17 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.

#### 4.7.5 Pengukuran Ekspresi IL-17 Jaringan

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 dH<sub>2</sub>O 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 dH<sub>2</sub>O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit.

Setelah endogenous peroksidasinya 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<sup>0</sup>C dengan primer antibodi yang diencerkan dengan perbandingan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH<sub>2</sub>O sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing masing selama 90 dan 60 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzydine 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 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

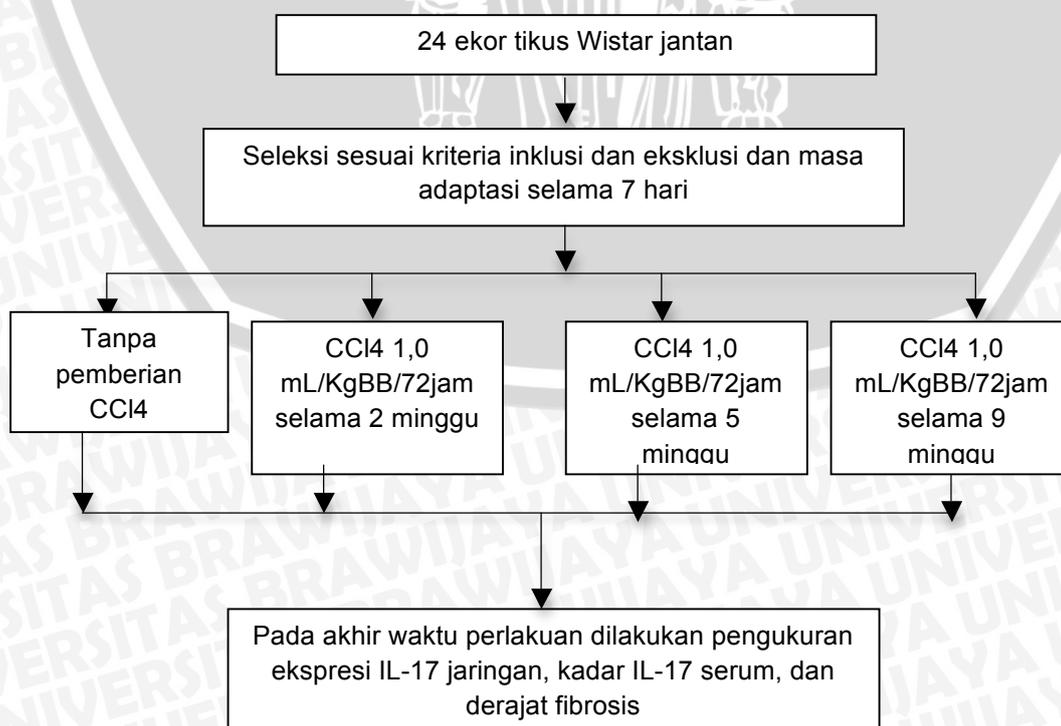
Pertama dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan dari fiksasi adalah untuk mengawetkan sel-sel melalui proses denaturalisasi protein, sehingga struktur inti sel tidak berubah. Setelah itu dilakukan pencucian gross dengan air mengalir 15 menit untuk menghilangkan sisa-sisa bahan fiksasi dehidrasi.

Kedua, dilakukan embedding. Potongan jaringan hati direndam ke dalam acetone 4 x 1 jam. Lalu, potongan jaringan hati direndam ke dalam xylol selama 4 x 1 jam. Setelah itu, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin cair (suhu 60oC) selama 4 x 1 jam. Terakhir, potongan jaringan hati direndam ke dalam parafin blok selama 24 jam.

Ketiga, dilanjutkan dengan penyayatan. Potongan jaringan hati disayat dengan mikrotom *rotatory/sliding* dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan ditaruh pada *water bath* (suhu 60oC). Sayatan ditaruh pada *object glass* yang telah terlebih dahulu diusap dengan mayer albumin, lalu didiamkan selama 24

jam. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan Hematoxilin Eosin (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 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 3 x 15 menit dan ditutup dengan *object glass* pada perekatan entelan/canada balsam. Eosin akan memberikan warna merah pada membran sel, sedangkan hematoxilin 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.

#### 4.7.7 Bagan Alur Penelitian



**Gambar 4.2** Alur penelitian

#### 4.8 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . Uji normalitas data akan menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal jika  $p > 0,05$ . Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji homogenitas varian akan menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen jika  $p = 0,05$ . Analisa data menggunakan SPSS versi 16 dengan derajat kepercayaan 95% dan  $\alpha = 0,05$ .

