

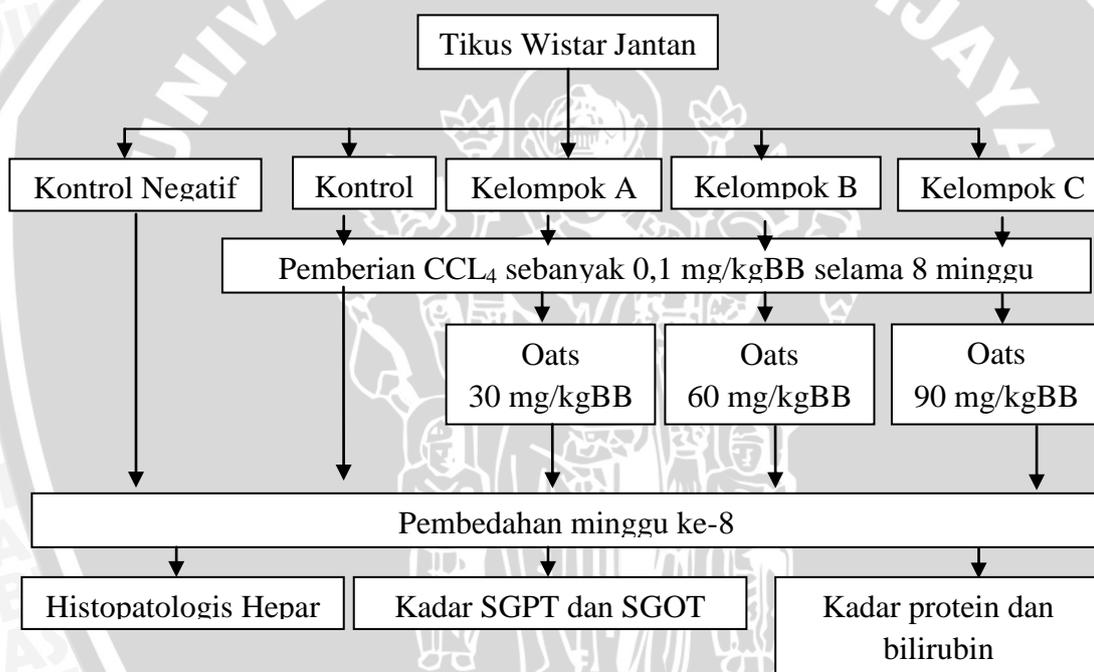
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.1.1 Skema Alur Penelitian



Gambar 2. Skema Alur Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah hewan model tikus strain Wistar jantan usia 6-7 minggu yang diinduksi oleh CCL₄ (*carbon tetrachloride*) dan perlakuan. Tikus Wistar jantan dipilih sebagai hewan coba karena terbukti dari penelitian sebelumnya tikus tersebut dapat terinduksi penyakit sirosis hepar dengan cepat.

Pemilihan usia 6-7 minggu dikarenakan pada usia tersebut masih belum terdapat pengaruh dari hormon-hormon pertumbuhan dan seksual yang dapat menjadi faktor perancu (*confounding*) selama penelitian.

Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian eksperimental untuk mencegah terjadinya bias. Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi:

1. Tikus strain Wistar jantan
2. Tikus berwarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.
3. Umur 6-7 minggu
4. Berat rata-rata 150 gram

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan sehingga tikus Wistar jantan dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok berdasarkan jenis pemberian diet dan bahan vaksin yang diberikan. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 1 Pembagian Kelompok Tikus Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	tidak diberikan perlakuan apapun
Kontrol Positif	Induksi CCL ₄ tanpa diberikan ekstrak oatss
Kelompok A	Induksi CCL ₄ + ekstrak oats 30 mg/kgBB
Kelompok B	Induksi CCL ₄ + ekstrak oats 60 mg/kgBB
Kelompok C	Induksi CCL ₄ + ekstrak oats 90 mg/kgBB

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

$n(p - 1) \geq 15$ (p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan), $p = 5$ sehingga :

$n(5 - 1) \geq 15 \rightarrow 4n \geq 15 \rightarrow n \geq 3,75$. Dibulatkan ke atas menjadi 4

pengulangan

sehingga jumlah tikus Wistar jantan yang digunakan sebanyak 20 ekor

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

1. Pemberian CCL₄ sebesar 0,5 ml/gram BB
2. Pemberian oats dalam berbagai dosis

4.3.2 Variabel Terikat

Kadar protein total serum tikus wistar

4.4 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Alokasi waktu untuk penyusunan proposal adalah bulan September 2011. Pelaksanaan penelitian sampai pembuatan laporan hasil penelitian adalah mulai bulan Maret sampai Juni 2012.

4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

1. Perawatan Tikus Wistar

Kandang pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan *cornfeed* (makanan standar tikus wistar).

2. Alat dan Bahan Untuk Induksi Tikus Wistar Model Sirosis Hepar

Sprit injeksi intraperitoneal dan CCL₄.

3. Pemberian ekstrak Oats (*Avena sativa L.*)

Aquades, oats, sonde.

4. Pembedahan Tikus

Gunting bedah, pinset, jarum pentul, stereofoam, kapas, klorofoam, formalin 10%, alkohol, botol film, spuit insulin, vacutainer

5. Pengukuran Kadar Protein Total

Sentrifus, ependorf, sampel darah tikus, liver function test

4.6 Definisi Istilah/Operasional

1. Oats yang digunakan adalah dari jenis *Avena sativa L.*, dimana jenis ini bisa dibeli dimana saja dalam bentuk kemasan. Selanjutnya oats ini

dihomogenisasikan dahulu dengan aquades kemudian diberikan dengan disondekan pada hewan coba.

2. Tikus Wistar jantan dipilih sebagai hewan coba karena terbukti dari penelitian sebelumnya tikus tersebut dapat terinduksi penyakit sirosis hepar dengan cepat. Pemilihan usia 6-7 minggu dikarenakan pada usia tersebut masih belum terdapat pengaruh dari hormon-hormon pertumbuhan dan seksual yang dapat menjadi faktor perancu (*confounding*) selama penelitian.
3. *Carbon tetrachloride* (CCL_4) di dapat dari lab farmakologi. Merupakan zat yang terbukti mampu menginduksi kerusakan hepar.

4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

1. Persiapan Hewan coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan, alkohol 70%, hewan uji, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium farmakologi selama tujuh hari dan dibagi lima kelompok.

2. Induksi kerusakan model sirosis

Penginduksian kerusakan hepar pada tikus dilakukan seperti metode standar yang telah dilakukan oleh Gao *et al.* (2009). CCL_4 digunakan sebagai agen yang dapat menginduksi terjadinya kerusakan hepar pada hewan coba. CCL_4 diberikan secara per oral sebanyak 1 ml/kg BB yang dicampurkan dengan minyak jagung dengan perbandingan 1:1 (v/v) sebanyak dua kali tiap minggunya selama delapan minggu (Gao *et al.*, 2008).

3. Pemberian ekstrak Oats pada tikus

Oats dihomogenisasi terlebih dahulu dengan aquades kemudian diberikan dengan cara disondekan pada tikus. Pemberian ragi dilakukan selama 6 minggu.

4. Pembedahan Tikus

Pembedahan dilakukan pada minggu ke-8. Hal tersebut didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya di mana induksi CCL₄ selama delapan minggu sudah dapat menginduksi terjadinya kerusakan hepar yang kronis pada tikus hewan coba (Fu *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009). Tikus dibunuh menggunakan anastesi klorofoam kemudian organ heparnya diambil dan diawetkan menggunakan formalin 10%. Setelah itu, darahnya (dari jantung) diambil untuk dilakukan pengecekan tes fungsi faal hepar.

5. Pengukuran Protein Total

Setelah pemberian oats selama 6 minggu, tikus dieuthanasia kemudian diambil darahnya dari jantung. Untuk mendapatkan serum darah, sampel darah yang diperoleh disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit. Kemudian serum dipisahkan ke dalam tabung ependorf. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap kadar enzim SGPT, SGOT, bilirubin total dengan menggunakan kit, serta pengukuran protein total dengan metode Biuret (Panjaitan *et al.*, 2007).

4.8 Analisis Data

Data protein total diambil setelah dilakukan pembedahan pada minggu ke-8. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc tukey* sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan

yang bermakna dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$. Uji statistik dicek dengan SPSS 16.

