

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 menentukan hubungan antara lama pemberian kurkumin dengan penurunan kadar TGF- β jaringan hati pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄). Menurut Li dkk., proses fibrogenesis mencapai puncak pada 48 jam pascainjeksi CCl₄ dan resolusi fibrosis (fibrolisis) terjadi 72 jam setelah proses fibrogenesis maksimal (Li et al., 2012), oleh karena itu kurkumin diberikan pada 48 jam pascainjeksi CCl₄. Pemberian kurkumin peroral akan dilakukan sebanyak 200 mg/kgBB/hari selama sembilan minggu (Fu et al., 2008). Setelah itu, dilanjutkan dengan pengukuran ekspresi TGF- β jaringan hati yang akan diukur pada minggu ke dua, ke lima, dan ke sembilan 72 jam pascapemberian kurkumin terakhir dengan mengorbankan kelompok tikus sesuai rentang waktu yang ditentukan.

Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu, kemudian dibagi menjadi 8 kelompok. Penelitian ini menggunakan 40 ekor tikus putih Wistar jantan yang dibagi kedalam 8 kelompok secara acak, terdiri dari K-negatif (kontrol negatif), dan K-positif, K-KK2, K-KP2, K-KK5, K-KP5, K-KK9, dan K-

KP9. yang merupakan kelompok perlakuan dengan CCl4 1,0 mL/kgBB setiap 72 jam.



Rancangan percobaan yang digunakan dengan analisis pada akhir perlakuan (*post test group design*) yang dapat dijelaskan pada tabel berikut :

| Kelompok | Minggu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|--|---|---|---|---|---|---|---|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | |
| 1 | K- Neg | Injeksi ip NaCl 1cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 2 | K- Pos | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 3 | KP-2 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Kurkumin 200 mg/KgBB po | X | | | | | | | | | |
| 4 | KK-2 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Diberikan pelarut | X | | | | | | | | | |
| 5 | KP-5 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Kurkumin 200 mg/kgBB po | | | X | | | | | | | |
| 6 | KK-5 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Diberikan pelarut | | | X | | | | | | | |
| 7 | KP-9 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Kurkumin 200 mg/kgBB po | | | | | | | | | X | |
| 8 | KK-9 | Injeksi ip CCl4 1 cc/kgBB 2x/minggu | | | | | | | | Diberikan pelarut | | | | | | | | | X | |
| Keterangan : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X=Waktu tikus dikorbankan, diambil organnya, serta dianalisis | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan yaitu jenis *Rattus norvegicus* galur Wistar yang diperoleh dari laboratorium farmakologi dan dipelihara serta dibedah di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus Wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur 2-3 bulan atau 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 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=8

n : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$n \geq 3,14 \sim 4$$

Sehingga, untuk keseluruhan penelitian ini tikus yang diperlukan adalah sebanyak 32 ekor. Untuk mengantisipasi tikus mati (17,5%), ditambah faktor koreksi sebesar 20% ($4 \times 20\% = 0,8 \sim 1$), dan sebagai antisipasi ditambahkan 1 lagi sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk setiap kelompok adalah enam dan untuk keseluruhan penelitian ini adalah sebanyak 48 ekor.

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Usia 2-3 bulan (8-12 minggu)
- c. Berat badan 150-250 gram
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas atau *independent variable* pada penelitian ini adalah lama pemberian kurkumin pada tikus.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung atau *dependent variable* pada penelitian ini adalah ekspresi TGF- β jaringan pada minggu ke-2, 5, dan 9.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl₄ yang dilakukan di laboratorium farmakologi dan pembedahan dilakukan di laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisis ekspresi TGF- β 1 jaringan hati dilakukan di laboratorium patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian \pm 5 bulan yaitu April-September 2016.

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, sebanyak 40 buah, dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti tiga kali sehari, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang, sekam, dan penimbangan berat badan dengan neraca sartorius. Setiap kandang berisi satu tikus.

- Alat Pembuat Makanan Tikus

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

- 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,

200x, dan 400X, disertai lensa okuler 10X dan lensa obyektif 100X, kaca obyek dan kaca penutup.

- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl₄

Pipet, beaker glass, spatula, spuit.

- Alat Pemberian Kurkumin

Sonde

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 CCl₄: CCl₄, minyak jangung, spuit, kapas, dan alkohol.
- Bahan pemberian kurkumin
- Bahan bedah tikus: alkohol, kapas, gunting, dan eter.
- Bahan untuk pemeriksaan patologi anatomi ekspresi TGF- β 1 jaringan hati

- 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 2-3 bulan dan berat 150-250 gram.
2. Ekspresi TGF- β yang dianalisis adalah TGF- β 1 jaringan hati dari pengecatan imunohistokimia dengan metode *hot spot*, menghitung rata-rata jumlah bintik berwarna kecoklatan pada seluruh preparat imunohistokimia. Adanya bintik berwarna coklat ini merupakan gambaran dari ekspresi TGF- β 1 yang diakibatkan oleh adanya ikatan antara antigen jaringan dengan antibodi yang diberikan dalam proses pembuatan preparat imunohistokimia untuk mengamati ekspresi TGF- β 1. Jumlah lapangan pandang pada pengamatan adalah 10 dengan perbesaran 400x.
3. Induksi CCl₄ yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl₄ sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0 mL/kgBB, yang terdiri dari 10% CCl₄ dan 90% minyak jagung, 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).

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 Penentuan derajat fibrosis hati menggunakan kriteria *Metavir Score* (Ziol et al., 2005), yakni:
 - F0: Tidak ada fibrosis
 - F1: Fibrosis portal tanpa septa
 - F2: Fibrosis portal dengan beberapa septa
 - F3: Beberapa septa dengan sirosis
 - F4: Sirosis

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

6. Paparan kurkumin adalah pemberian kurkumin peroral dengan dosis 200 mg/kgBB/hari (Fu et al., 2008; Gangarapu et al., 2013). Kurkumin yang digunakan adalah *Curcumin* (kemurnian >94%) yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) (Zheng dan Chen, 2004). Untuk membuat , pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1% (Purwanti E., et al, 2009).

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih

4.7.1.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan

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 dengan pemberian diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan dan mencapai berat badan sesuai dengan kriteria. 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 berjumlah 40 buah diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label K-negatif, K-positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9, KK-9 dengan isi 1 ekor tikus setiap kandang.
5. Kandang diberi alas berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan sekam diganti setiap tiga 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 CCl₄ intraperitoneal dosis 1,0mL/KgBB setiap 72 jam pada kelompok perlakuan.
9. Pencatatan pada logbook dilakukan setiap kali melakukan tindakan pada hewan coba

4.7.1.2 Perlakuan Fisik

1. Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberi perlakuan seperti penimbangan berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida. Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan 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 dengan 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 bernapas. Kemudian, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal
2. Berat badan tikus ditimbang dan dicatat di awal percobaan untuk memastikan tikus sesuai dengan kriteria inklusi berat badan 150-250 gram
3. Seminggu setelah adaptasi, induksi fibrosis hati dilakukan pada kelompok K-positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9, dan KK-9, dengan injeksi CCl₄ dosis 1 mL/KgBB secara intraperitoneal. Berat badan tikus ditimbang

sebelum injeksi untuk menentukan dosis CCl₄. Injeksi diberikan dua kali seminggu

4. Injeksi CCl₄ 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
5. Kurkumin diberikan ke kelompok KP-2, KP-5, dan KP-9 dengan sonde setiap hari dengan dosis 200 mg/KgBB/hari selama 2, 5, dan 9 minggu

4.7.1.3 Perlakuan Perilaku

1. 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
2. Perlakuan terhadap tikus seperti pengukuran berat badan dan pemberian CCl₄ dilakukan pada pagi hari pukul 10.00 karena tikus merupakan binatang yang aktif ketika malam hari hingga pagi hari
3. Pembedahan dilakukan setelah tikus dikorbkan dengan anestesi inhalasi eter. Teknik pembedahan dilakukan menurut prosedur tetap pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah :
 - a. Tikus dikorbkan dengan inhalasi eter

- b. Tikus diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin
- c. Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan
- d. Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok
- e. Bila perlu, bulu tikus dicukur pada bagian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air
- f. Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus (organ yang diambil adalah darah, hepar, lambung)
- g. Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan
- h. Organ dicuci dengan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah
- i. Organ kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% berulang-ulang
- j. Organ ditiriskan diatas kertas saring
- k. Setelah air berkurang, organ ditempatkan pada cawan petri kering kemudian ditimbang
- l. Bobot masing-masing organ dicatat
- m. Organ yang telah ditimbang kemudian dimasukkan dalam pot berisi formalin 4% dan buffer formalin
- n. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan seluruh derajat fibrosis hati dan sirosis
- o. Setelah dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan dengan sabun

4.7.1.4 Rasa Nyeri

1. Nyeri akan timbul akibat injeksi CCl₄ melalui intraperitoneal. Oleh karena itu, sebelum injeksi tikus diinhalasi isofluran yang dilakukan hingga kecepatan pernapasan tikus melambat dan kesadaran menurun. Kemudian inhalasi dihentikan dan tikus diinjeksikan CCl₄ i.p.. Tikus yang telah diinjeksikan dimasukkan kembali ke kandang.
2. 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 menggeliat, asupan makanan, air, dan agresivitas saat diberikan perlakuan
3. Mengorbankan tikus berdasarkan salah satu metode yang dicantumkan dalam *AVM Guidelines on Euthanasia* (2007) yaitu dengan inhalasi eter. Inhalasi eter dapat mendepresikan langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang menyebabkan hipoksia. Inhalasi eter dilakukan dengan memasukkan kedalam tabung berisi eter kemudian ditutup. Tikus ditunggu hingga tidak bergerak, kemudian kematian dipastikan dengan memeriksa tanda-tanda vital. Metode mengorbankan hewan menggunakan

inhalasi eter karena efek depresan cepat dan mudah dilakukan dengan menggunakan wadah tertutup

4.7.1.5 Bahaya Potensial

1. Perlakuan terhadap hewan seperti penyuntikan CCl₄ dapat menimbulkan stres pada tikus. Untuk itu dilakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati
2. Infeksi yang dapat terjadi akibat penyuntikan CCl₄ 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 CCl₄

1. CCl₄ diambil dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari.
2. CCl₄ dilarutkan dengan minyak jagung sebanyak 1:10 di dalam *beaker glass*, yaitu untuk CCl₄ sebanyak 5 mL dan minyak jagung 50 mL dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.
3. Pengambilan larutan CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/kgBB.
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Penginduksian CCl₄ 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 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. (Purwanti E., *et al.* 2009) Perlakuan dengan diberikan secara oral melalui sonde dengan dosis 200mg/kgBB/hari.

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

1. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan seluruh derajat fibrosis hati dan sirosis
2. Sebelum pembedahan, tikus dianestesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan *styrofoam*. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas *styrofoam*
4. Torak dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas ke arah lateral, sehingga organ dalam rongga abdomen terlihat
5. Dilakukan pengambilan darah, hepar, dan lambung
6. Tikus dikuburkan di dalam satu lubang sejauh setengah meter, dikerjakan oleh pihak laboratorium farmakologi

4.7.5 Pengukuran Ekspresi TGF- β 1 Jaringan

1. Pengukuran ekspresi TGF- β 1 jaringan hati dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Metode imunohistokimia 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.
2. Sebelum proses pewarnaan, setiap sediaan preparat dideparafinasi dengan xylene selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol yang konsentrasinya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70%, dan 60% selama masing-masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan H₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) selama 5 menit.
3. Setelah terehidrasi, potongan paraffin 4 μ m pada objek glass diinkubasi dalam hidrogen peroxide 3% untuk mengeblok aktivitas peroxidase endogen.
4. Antibodi tikus monoclonal antihuman TGF- β 1 bereaksi dengan bentuk monomeric dan dimeric TGF- β 1 yang tersedia sebagai larutan 1:500 (dilusi didalam bovine serum albumin 3%) dan diinkubasi pada suhu 4°C satu malam.
5. Setelah 5 menit dicuci di dalam PBS, slide dilindungi oleh *goat antimouse IgG horseradishperoxidase-labeled* antibodi sekunder pada larutan 1:500 (dilusi dalam bovine serum albumin 3%) selama 30 menit pada suhu ruangan.

6. Ikatan antibody. terdeteksi dengan *staining kit*.
7. Slide dicat dengan menggunakan diaminobenzidine, dicuci, dicat dengan Mayer's hematoxylin, didehidrasi 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.

4.7.6 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

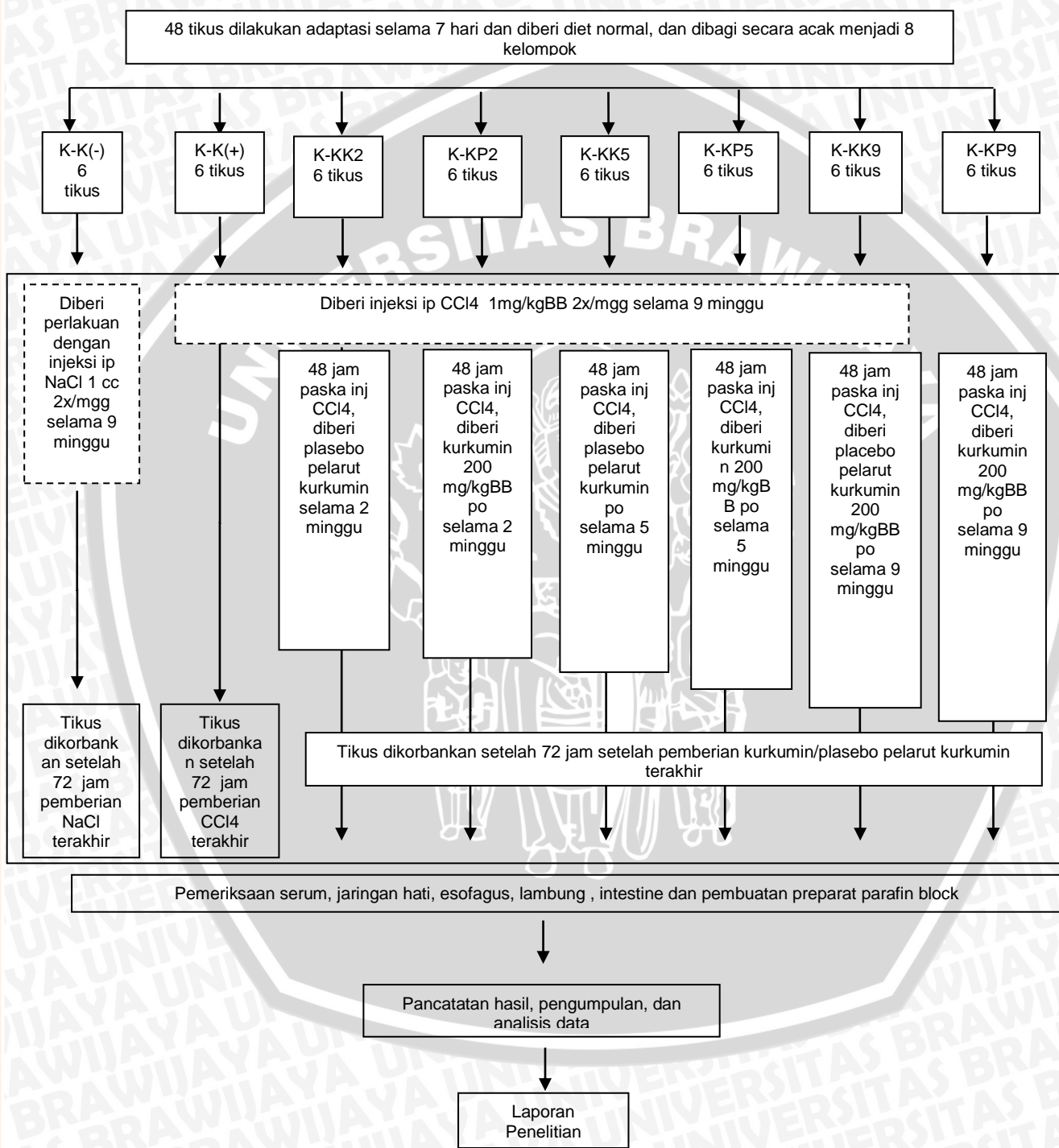
Pertama dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan dari fiksasi adalah untuk 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 aceton 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 mikrofon *rotatory/sliding* dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan

ditaruh pada *water bath* (suhu 60°C). 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 mean \pm SD. Untuk mengetahui hubungan 2 kelompok digunakan *Korelasi Linear Regresi* setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Sebaran data penelitian dinyatakan normal apabila pada uji normalitas data menunjukkan $p > 0,05$. Varian data penelitian dinyatakan homogen apabila pada uji homogenitas varian menunjukkan $p = 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji post hoc untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui keragaman setiap perlakuan menggunakan uji parametrik *One Way Analysis of Variance (ANOVA)* dengan alternatif menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilakukan uji *post-hoc* dengan uji *Tukey* atau uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui satu kelompok yang memiliki perbedaan paling bermakna. Data hasil penelitian dianalisa dengan menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 16 dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.

4.9 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel-tabel sbb:

1. Tabel karakteristik subjek penelitian dan rerata ekspresi TGF- β 1 pada jaringan hati

Gambar 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 CCl ₄ 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| 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 | | | | | | |
| | | | | | | |

2. Grafik korelasi antara lama pemberian kurkumin dan ekspresi TGF- β 1 yang diharapkan

Gambar 4.4 Grafik korelasi yang diharapkan

