

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian tahap kedua yang merupakan lanjutan dari pohon penelitian “Peran curcuma pada fibrogenesis tikus *wistar rattus novergicus* yang dipapar dengan CCl₄” yang merupakan penelitian tahap pertama. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo pada hewan coba tikus putih (*rattus norvegicus strain wistar*) dengan analisis pada akhir perlakuan (*post test group design*) yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Hewan coba dibagi dalam 8 kelompok dan diberi perlakuan, sbb:

Kelompok	Minggu																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1 K-Neg	injeksi ip NaCl 1cc 2x / minggu									X									
2 K-Pos	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									X									
3 KP-2	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 2 minggu	X								
4 KK-2	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin	X								
5 KP-5	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 5 minggu		X							
6 KK-5	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin		X							
7 KP-9	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									kurkumin 200 mg/kg 9 minggu			X						
8 KK-9	injeksi ip CCl ₄ 1cc/kgBB 2x / minggu									Diberikan pelarut kurkumin			X						

Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan:

- K-Neg : kelompok negatif, tikus hanya diberi injeksi NaCl 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu.
- K-Pos : kelompok positif, tikus diberi injeksi CCl₄ 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu.



- KP-2 : kelompok perlakuan 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada kelompok K-Pos kemudian diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 2 minggu.
- KK-2 : kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada K-Pos kemudian diberi pelarut kurkumin selama 2 minggu.
- KP-5 : kelompok perlakuan 5 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada kelompok K-Pos kemudian diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 5 minggu.
- KK-5 : kelompok kontrol 5 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada K-Pos kemudian diberi pelarut kurkumin selama 5 minggu.
- KP-9 : kelompok perlakuan 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada kelompok K-Pos kemudian diberi paparan kurkumin 200 mg/kg BB selama 9 minggu.
- KK-9 : kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberi injeksi CCl₄ seperti pada K-Pos kemudian diberi pelarut kurkumin selama 9 minggu.
- Tanda *) merupakan waktu tikus dikorbankan

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi secara acak menjadi 8 kelompok, semua tikus diadaptasi (*acclimatized*) selama 7 hari. Tikus dalam kelompok kontrol negatif (K-negatif) tidak diberikan injeksi CCl₄ tapi diberi injeksi NaCl dan tikus dalam kelompok kontrol positif (K-positif) dan kelompok perlakuan (KP2, KP5, KP9) diberikan injeksi CCl₄ intraperitoneal (ip) dengan dosis 1 mg/kgBB, 2 kali per minggu selama 9 minggu. Proses fibrogenesis mencapai puncak pada 48 jam pasca injeksi CCl₄ dan fibrolisis terjadi 72 jam setelah proses fibrogenesis maksimal (Li *et al.*, 2012). Dosis kurkumin diberikan sebesar 200 mg/kgBB/hari selama sesuai kelompok perlakuan. (Fu *et al.*, 2008). Semua tikus dikorbankan (*sacrificed*) 48+72=120 jam (5 hari) paska perlakuan sesuai kelompok masing-masing. Untuk kelompok perlakuan KP2, KP5, dan KP9, diberikan kurkumin sesuai dosis di atas, sedangkan kelompok perlakuan KK2, KK5, dan KK9 diberikan plasebo pelarut kurkumin saja, sedangkan kontrol positif dan negatif tidak diberikan apa-apa.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan yaitu jenis *Rattus Norvegicus* galur wistar yang dipelihara di Laboratorium dan dibedah di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur ± 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.

Jumlah besar sampel yang digunakan untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, menggunakan rumus Federer (1963) dalam Wardhani (2007), yaitu :

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

dimana, t : banyaknya kelompok perlakuan,
 n : jumlah sampel penelitian

pada penelitian ini $t = 8$, sehingga didapatkan hasil :

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

$$7(r-1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 15 + 7$$

$$r \geq 22/7$$

$$r \geq 3,15 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

sehingga, sampel yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 4. Untuk mengantisipasi adanya tikus yang meninggal (17,5%), (Li, *et al.* 2012) tiap kelompok ditambahkan faktor koreksi sebesar 20%, sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan adalah $4 + (4 \times 20\%) = 4 + 0,8 = 4,8$ atau minimal 5. Pada penelitian ini kami tetapkan jumlah sampel pada setiap kelompok sebanyak 5 tikus.

Jadi secara keseluruhan diperlukan $8 \times 5 = 40$ tikus.

4.2.3 Sampel Penelitian

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* berjenis kelamin jantan
- b. Usia 2 – 3 bulan
- c. Berat badan 150 - 250 gram
- d. Kondisi tikus sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan sehingga mengganggu kesehatan
- b. Tikus sakit atau 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 atau *independent variable* pada penelitian ini adalah pemberian dan lama kurkumin pada tikus.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung atau *dependent variable* pada penelitian ini adalah Kadar Malondialdehyde (MDA) serum.

4.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih jantan *strain wistar*, pemberian CCl₄, kandang tikus, makanan, dan minuman tikus.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian rencanakan dilakukan sekitar 6 bulan mulai bulan Maret sampai 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 dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus.

- Alat Pembuat Makanan Tikus

Baskom plastik, timbangan, handscoon, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan.

- Alat Pengambil Serum (plasma)

Seperangkat alat bedah minor (sputit, kapas, tabung reaksi, pinset, scaple, gunting), spuit 5mL, kapas, seperangkat tabung reaksi.

- Sonde untuk pemberian perlakuan beserta tube ukuran 1,5 mL dan 15 mL.

- Alat Pemeriksaan MDA serum

- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl₄
Pipet, beaker glass, spatula,spuit.

4.5.2 Bahan

- Hewan coba : tikus *rattus norvegicus strain winstar* sesuai kriteria inklusi.
- Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- Bahan pembuatan pakan standar: Pakan standar tikus berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- Bahan pembuatan larutan CCl₄ : CCl₄, minyak jangung.
- Bahan pakan paparan kurkumin
- Bahan reagensia MDA serum
- Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, ether.

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.
2. Diet normal berupa pakan standart konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
3. Induksi CCl₄ yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl₄ sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0 mL/KgBB, yang terdiri dari 50% CCl₄ dan 50% 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 *Establiment*

of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat (Li *et al.*, 2012).

4. Paparan kurkumin adalah pemberian kurkumin peroral dengan dosis 200 mg/kgBB/hari (Fu *et al.*, 2008) (Gangarapu *et al.*, 2013). Kurkumin yang digunakan adalah Kurkumin (kemurnian >94%) yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). (Zheng and Chen, 2004). Untuk membuat, pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1%.
5. Kadar *Malondialdehyde* (MDA) serum

Kadar *Malondialdehyde* MDA yang disimpan dalam suhu freezer -80°C dan dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu -20°C selama 1 hari, lalu dipindahkan ke lemari es dengan suhu -4°C . Kemudian dianalisa dengan metode TBARS.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Perlakuan Terhadap Tikus

1. Persiapan sebelum pemeliharaan tikus

Sebelum pemeliharaan, peneliti mempersiapkan kandang tikus sejumlah 40 buah dan memberi label pada kandang tikus sesuai dengan kelompok perlakuan. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus bisa bernapas dengan ventilasi udara yang cukup. Peneliti juga menyiapkan tempat minum untuk tikus yang bersih dan dilengkapi dengan sedotan sehingga tikus bisa dengan mudah meminum air.

2. Pemeliharaan tikus

- Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan kondisi laboratorium selama satu minggu.
- Pemeliharaan tikus dilakukan selama 2-18 minggu.
- Memberikan pakan berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
- Makanan dan air ditambahkan setiap hari secukupnya.
- Lingkungan tempat pemeliharaan tikus dikondisikan 12 jam terang selama pukul 06.00 hingga 18.00 dan 12 jam gelap selama pukul 18.00 hingga 06.00.
- Alas sekam diganti seminggu dua kali untuk menjaga kebersihan kandang dan tikus.
- Pencatatan pada logbook dilakukan setiap kali melakukan tindakan pada hewan coba.

3. Perlakuan fisik

- Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti penimbangan berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida. Sebelum memegang tikus, peneliti mendekati 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 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 bernafas. Kemudian, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- Berat badan tikus ditimbang dan dicatat di awal percobaan untuk memastikan tikus sesuai dengan kriteria inklusi berat badan 150-250 g.
- Seminggu setelah adaptasi, induksi fibrosis hati dilakukan kepada pada kelompok perlakuan kontrol positif, KP2, KK2, KP5, KK5, KP9, dan KK9. injeksi karbon tetraklorida dengan dosis 1 ml/kg berat badan secara intraperitoneal. Berat badan tikus ditimbang sebelum induksi fibrosis hati untuk menentukan dosis karbon tetraklorida yang akan diberikan. Injeksi diberikan dua kali seminggu.
- Injeksi karbon tetraklorida dilakukan setelah tikus dianestesi dengan alkohol. 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.
- Sembilan minggu setelah penyuntikan Karbon tetraklorida kedalam tikus, diberikan ekstrak kurkumin selama sesuai kelompok perlakuan. KP2 selama 2 minggu, KP5 selama 5 minggu, KP9 selama 9 minggu. Pemberian plasebo pelarut kurkumin kepada kelompok perlakuan KK2 selama 2 minggu, KK5 selama 5 minggu, dan KK9 selama 9 minggu.

4. Perlakuan Perilaku

- 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.
- Perlakuan terhadap tikus seperti, pengukuran berat badan dan pemberian karbontetraklorida dilakukan pada pagi hari pukul 10 karena tikus binatang yang aktif ketika malam hari hingga pagi hari.

5. Pembedahan

Pembedahan dilakukan setelah euthanasia dengan inhalasi gas eter. Teknik pembedahan dilakukan menurut Prosedur Tetap Pembedahan Hewan Uji dengan langkah-langkah :

- Tikus di euthanasia dengan inhalasi eter.
- Tikus diposisikan pada papan bedah dengan menggunakan pin.
- Tubuh tikus dipastikan terfiksasi dengan baik pada papan sehingga memudahkan tahap pembedahan.
- Pembedahan dimulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok.
- Bila perlu, bulu tikus dicukur pada bagian perut dan sisa bulu dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air.
- Masing-masing organ diambil dan dipisahkan dengan menggunakan gunting lurus (organ yang diambil adalah darah, hepar, otak, esofagus-gaster-intestin, paru, limpa dan ginjal).
- Lemak-lemak yang menempel pada organ dibersihkan

- Organ dicuci dengan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah.
 - Organ kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% berulang-ulang.
 - Organ ditiriskan diatas kertas saring.
 - Setelah air berkurang, organ ditempatkan pada cawan petri kering kemudian di timbang.
 - Bobot masing-masing organ dicatat.
 - Organ yang telah ditimbang kemudian dimasukkan dalam pot berisi formalin 4% dan buffer formalin.
 - Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
 - Setelah dilakukan pembedahan dan pengambilan organ, tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan dengan sabun.
6. Tindakan mematikan/mengorbankan hewan

Euthanasia dilakukan setelah pemberian suplemen ALA tiga minggu berdasarkan salah satu metode euthanasia yang dicantumkan dalam *AVM Guidelines on Euthanasia* (2007) yaitu dengan inhalasi eter. Inhalasi eter dapat mendepresi langsung korteks serebral, struktur subkortikal, dan otot jantung yang menyebabkan hipoksia. Inhalasi eter dilakukan dengan memasukkan kedalam tabung berisi eter dan kemudian ditutup. Tikus di tunggu hingga tidak bergerak, kemudian kematian dipastikan dengan memeriksa tanda-tanda vital. Metode Euthanasia menggunakan inhalasi eter karena efek depresan cepat dan mudah dilakukan dengan menggunakan wadah tertutup.

7. Bahaya potensial yang dapat terjadi selama pemeliharaan dan cara pencegahan yang dilakukan.

- Perlakuan terhadap hewan seperti penyuntikan karbonditoksida dapat menimbulkan stres pada tikus. Untuk itu dilakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
- Infeksi yang dapat terjadi akibat penyuntikan karbonditoksida secara terus menerus dapat dicegah dengan pemberian alkohol sebagai topical antiseptik sebelum injeksi dan jarum yang digunakan baru dan steril untuk masing-masing tikus.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl_4

1. Mengambil CCl_4 dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari.
2. Melarutkan CCl_4 dengan minyak jagung sebanyak 1:9 didalam beaker glass, yaitu 5 mL CCl_4 dan 5mL minyak jagung dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduknya hingga tercampur rata.

4.7.3 Pembedahan dan Pengambilan Organ

1. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
2. Sebelum pembedahan, 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. Torak dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen

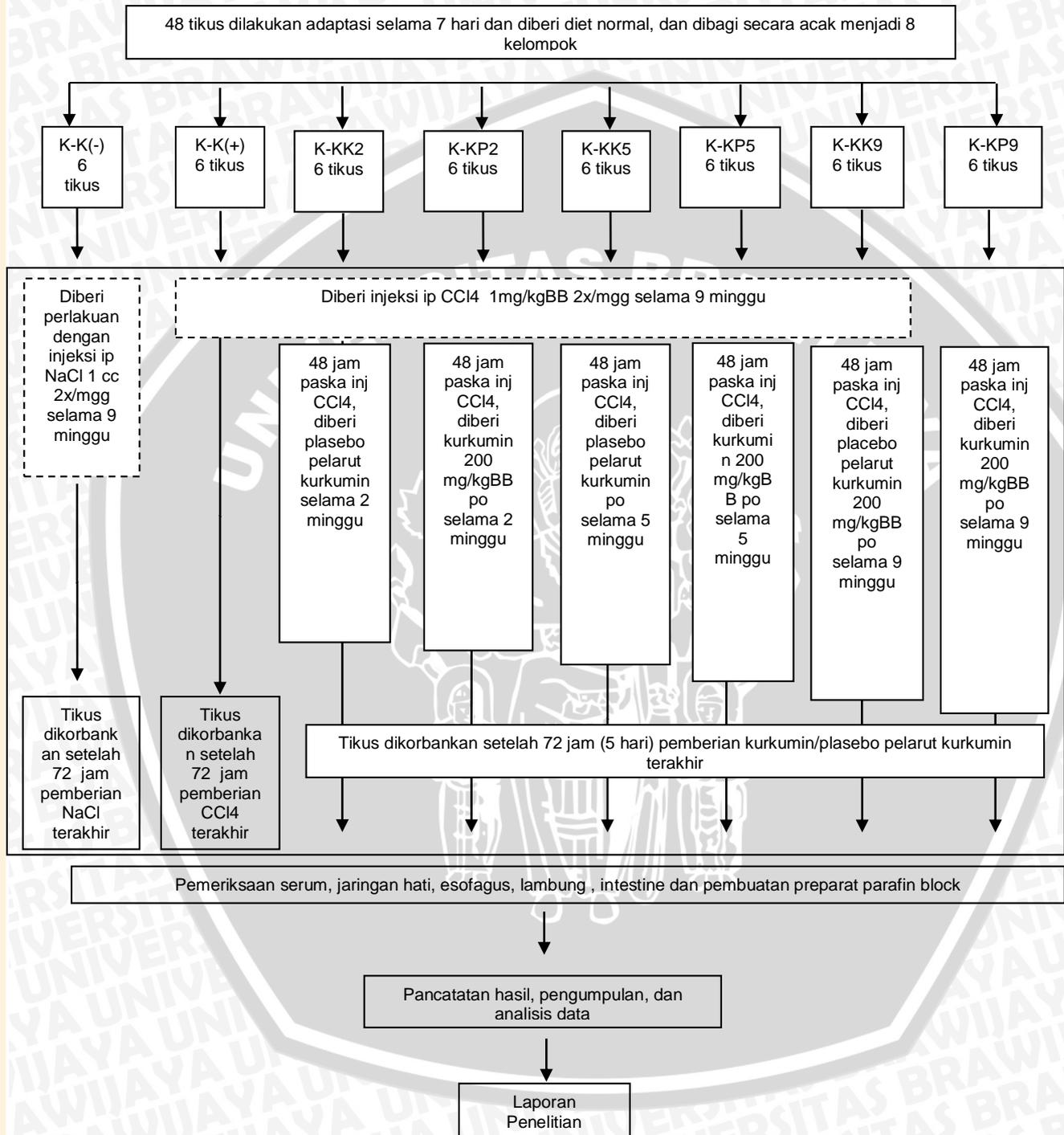
diperluas ke arah lateral, sehingga organ dalam rongga abdomen terlihat.

5. Dilakukan pengambilan darah tikus yang diambil dari ventrikel jantung dengan menggunakan jarum suntik.
6. Darah diambil 5 mL lalu dimasukkan dalam tabung endorf 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* MDA serum

- Serum diambil sebanyak 0,5ml.
- Presipitasi dengan menambahkan 1,25 ml TCA 10% kemudian divortex hingga homogen.
- Ditambahkan 0.2ml HCl 1N kemudian divortex hingga homogen.
- Ditambahkan Na-thiobarbituric acid 0,1 ml dan divortex.
- Dipanaskan di dalam waterbath dengan suhu 100 derajat celsius selama 25 menit kemudian angkat dan dibiarkan dingin dengan suhu ruang.
- Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
- Diambil supernatant dalam tabung dengan pipet dan saring dengan kertas saring yang diletakkan pada blue tip yang telah dipotong ujungnya.
- Kemudian jadikan hasilnya menjadi 3cc dengan menggunakan aquadest.
- Baca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm.

4.7.5 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian



4.8 Pengolahan Data

4.8.1 Uji Analisis

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$. Untuk mengetahui hubungan 2 kelompok digunakan *korelasi linier 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 *Tuckey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui keragaman setiap perlakuan menggunakan uji parametrik *One Way Analysis of Variance* (ANOVA). Kemudian dilakukan uji *post-hoc* untuk mengetahui satu kelompok yang memiliki perbedaan paling bermakna. Data hasil penelitian dianalisa dengan menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 22 dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$. Uji statistik dinyatakan signifikan apabila $p < 0,05$.

4.8.2 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

Pelaporan hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel-tabel sbb:

1. Tabel karakteristik subjek penelitian dan rerata kadar MDA serum

Perlakuan	Tikus	Berat Badan Awal (gram)	Berat Badan Akhir (gram)	Mean Kadar MDA Serum (ng/mL)	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 kurkumin (200mg/kgBB) selama 2 minggu					
KK-2 Sonde pelarut kurkumin selama 2 minggu					
KP-5 Sonde kurkumin (200mg/kgBB) selama 5 minggu					
KK-5 Sonde pelarut kurkumin selama 5 minggu					
KP-9 Sonde kurkumin (200mg/kgBB) selama 9 minggu					
KK-9 Sonde pelarut kurkumin selama 9 minggu					

Gambar 4.3 Format tabel pelaporan hasil perhitungan