

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya dengan *Rancangan Acak Lengkap* (RAL). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan antara lama pemberian kurkumin dengan penurunan ekspresi IL-17 jaringan hati pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄). Proses fibrogenesis mencapai puncak pada 48 jam pasca injeksi CCl₄ dan resolusi fibrosis (fibrolisis) terjadi 72 jam setelah proses fibrogenesis maksimal (Li *et al.*, 2012), oleh karena itu kurkumin diberikan pada 48 jam pasca injeksi CCl₄. Pemberian kurkumin peroral akan dilakukan sebanyak 200 mg/kgBB/hari selama sembilan minggu (Fu *et al.*, 2008). Setelah itu, dilanjutkan dengan pengukuran IL-17 jaringan hati yang akan diukur selama 2, 5, dan 9 minggu pasca 72 jam pemberian kurkumin terakhir dengan mengorbankan kelompok tikus sesuai rentang waktu yang ditentukan.

Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari, kemudian dibagi menjadi 8 kelompok. Penelitian ini menggunakan 48 ekor tikus putih strain wistar jantan yang dibagi kedalam 8 kelompok secara acak, terdiri dari K-Negatif, K-Positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9, KK-9. Injeksi CCl₄ diberikan selama 9 minggu agar menghasilkan fibrosis hati derajat 3 (F3). Terapi kurkumin diberikan selama 2, 5, dan 9 minggu. Pemberian kurkumin selama 2, 5, dan 9 minggu menyesuaikan dengan

pengalaman penelitian sebelumnya, dimana injeksi CCl_4 selama 2 minggu akan menghasilkan fibrosis hati derajat 1 (F1), injeksi CCl_4 selama 5 minggu akan menghasilkan fibrosis hati derajat 2 (F2), dan injeksi CCl_4 selama 9 minggu akan menghasilkan fibrosis hati derajat 3 (F3).

Rancangan percobaan yang digunakan dengan analisis pada akhir perlakuan (*Post Test Group Design*) sebagai berikut :

| No | Nama Kelompok | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | | |
|----|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|---|
| 1. | K-Neg | NaCl 0,9 % Intraperitoneal | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 2. | K-Pos | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 3. | KP-2 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | |
| 4. | KK-2 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | X | | | | | | | |
| 5. | KP-5 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 6. | KK-5 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 7. | KP-9 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 8. | KK-9 | Injeksi CCl_4 IP 1 ml/kgBB 2xseminggu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X |

Gambar 4.1. Perlakuan pada hewan coba

Keterangan :

- K-Neg : Kelompok negatif, tikus hanya diberikan injeksi NaCl 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu.
- K-Pos : Kelompok positif, tikus diberikan injeksi CCl_4 1 ml 2x/minggu selama 9 minggu.

- KP-2 : Kelompok perlakuan 2 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti kelompok K-Pos dan diberikan paparan kurkumin 200 mg/kgBB selama 2 minggu.
- KK-2 : Kelompok kontrol 2 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti pada K-Pos dan diberikan pelarut kurkumin selama 2 minggu.
- KP-5 : Kelompok perlakuan 5 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti kelompok K-Pos dan diberikan paparan kurkumin 200 mg/kgBB selama 5 minggu.
- KK-5 : Kelompok kontrol 5 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti pada K-Pos dan diberikan pelarut kurkumin selama 5 minggu.
- KP-9 : Kelompok perlakuan 9 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti kelompok K-Pos dan diberikan paparan kurkumin 200 mg/kgBB selama 9 minggu.
- KK-9 : Kelompok kontrol 9 minggu, tikus diberikan injeksi CCl_4 seperti pada K-Pos dan diberikan pelarut kurkumin selama 9 minggu.
- Tanda **X** merupakan waktu dimana tikus akan dikorbankan.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah tikus jantan jenis (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang dipelihara dan dibedah di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan sekitar 5 bulan mulai bulan Mei - September 2016.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar

dengan jenis kelamin jantan, dengan usia 2-3 bulan, 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 Suprpto J (2000), yaitu:

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

Dimana, t : banyaknya jumlah perlakuan, pada penelitian ini t = 8

r : jumlah pengulangan (replikasi)

Sehingga didapatkan pengulangan sebesar:

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

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

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 15 + 7$$

$$r \geq 22/7$$

$$r \geq 3,14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

Jumlah pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal sebanyak 4 tikus. Untuk mengantisipasi adanya tikus yang meninggal tiap kelompok ditambahkan faktor koreksi sebesar 20% ($4 \times 20\% = 0,8 \sim 1$), dan sebagai antisipasi ditambahkan 1 tikus sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan adalah minimal 5 tikus. Pada penelitian ini ditetapkan jumlah sampel pada setiap kelompok sebanyak 6 tikus. Jadi secara keseluruhan diperlukan $8 \times 6 = 48$ tikus.

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

| KELOMPOK | PERLAKUAN | JUMLAH TIKUS |
|-------------------|--|--------------|
| Kontrol Negatif | Kelompok fibrosis derajat 0, tanpa paparan CCl ₄ | 6 |
| Perlakuan Positif | Kelompok kontrol positif dianggap telah mengalami fibrosis dan dikorbankan 48 jam pasca paparan CCl ₄ terakhir | 6 |
| Perlakuan KP-2 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian kurkumin 200 mg/kgBB peroral selama 2 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian kurkumin terakhir | 6 |
| Perlakuan KP-5 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian kurkumin 200 mg/kgBB peroral selama 5 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian kurkumin terakhir | 6 |
| Perlakuan KP-9 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian kurkumin 200 mg/kgBB peroral selama 9 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian kurkumin terakhir | 6 |
| Perlakuan KK-2 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian pelarut kurkumin selama 2 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian pelarut kurkumin terakhir | 6 |
| Perlakuan KK-5 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian pelarut kurkumin selama 5 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian pelarut kurkumin terakhir | 6 |
| Perlakuan KK-9 | Kelompok perlakuan dianggap telah fibrosis, dilanjutkan dengan pemberian pelarut kurkumin selama 9 minggu, lalu dikorbankan setelah 72 jam pemberian pelarut kurkumin terakhir | 6 |

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar berjenis kelamin jantan
- b. Usia 2-3 bulan
- 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 sehingga mengganggu kesehatan selama masa penelitian
- b. Tikus yang sakit atau mati selama masa perlakuan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

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

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung atau *dependent variable* adalah ekspresi IL-17 jaringan selama 2, 5, dan 9 minggu

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 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl₄ yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya. Analisis ekspresi IL-17 jaringan hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian \pm 5 bulan yaitu bulan Mei - September 2016.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

a. Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm sebanyak 8 kandang dan setiap kandang berisi 6 tikus, dengan alas sekam yang bersih dan kering serta akan diganti dua hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang, dan sekam. Penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

b. Alat Pembuat Makanan Tikus

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

c. 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, dan 200x, disertai lensa okuler 10x dan lensa obyektif 100x, kaca obyektif, dan kaca penutup.

d. Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl_4

Pipet, beaker glass, spatula, spuit.

e. Alat Pemberian Kurkumin

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

4.5.2 Bahan

- Hewan coba : tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar sesuai kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.
- Bahan perawatan tikus: air, sekam, dan 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 dan pemberian larutan CCl_4 : CCl_4 , minyak jagung.
- Bahan pakan paparan kurkumin.
- Bahan untuk pemeriksaan ekspresi IL-17 jaringan hati: kit imunohistokimia IL-17.
- Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, dan ketamin.
- Bahan penentuan derajat fibrosis hati: formalin 10% , acetone, xylol, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, pewarnaan HE, alkohol 95%, air, hematoxilin, dan lithium karbonat.

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan usia 2-3 bulan dan berat 150 - 250 gram.
2. 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 10 lapang pandang dan dianalisa dengan mikroskop dengan pembesaran 400x.

3. Induksi CCl_4 yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl_4 sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1 ml/kgBB yang terdiri dari 50% CCl_4 dan 50% minyak jagung setiap 72 jam selain pada kelompok kontrol negatif dengan lama paparan sesuai dengan derajat fibrosis yang akan dicapai dan berpedoman pada penelitian sebelumnya, yaitu kriteria *Metavir Score* (Ziol *et al.*, 2005)
4. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.
5. Penentuan derajat fibrosis hati menggunakan kriteria *Metavir Score* (Ziol *et al.*, 2005) dengan interpretasi sebagai berikut:
 - F0 : Tidak ada fibrosis
 - F1 : Fibrosis terlokalisasi pada areal portal tanpa septa, dengan gambaran fibrosis perisinusoidal dan intralobular fibrosis
 - F2 : Fibrosis pada daerah perifer area portal dan gambaran septa yang jarang
 - F3 : Terbentuknya banyak septa dengan diikuti kerusakan struktur intralobular, tanpa adanya sirosis
 - F4 : Sirosis hepar

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

6. Paparan kurkumin adalah pemberian kurkumin peroral melalui sonde dengan dosis 200 mg/kgBB/hari (Fu *et al.*, 2008). Kurkumin yang

digunakan adalah kurkumin dengan kemurnian > 94% yang dibeli dari Sigma (Zheng dan Chen, 2004). Untuk membuat kurkumin, pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1%.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Perlakuan dan Pemeliharaan terhadap Tikus

4.7.1.1 Persiapan Sebelum Pemeliharaan Tikus

1. Sebelum dilakukan pemeliharaan semua tikus di masukkan secara acak pada kandang sudah tersedia, kemudian dilakukan penimbangan berat badan pada semua tikus.
2. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu dengan kondisi laboratorium selama satu minggu.
3. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup.
4. Kandang diletakkan pada suhu ruangan 25-28°C. Tikus diberikan tempat minum yang bersih dan dilengkapi dengan sedotan sehingga tikus bisa dengan mudah meminum air.
5. Memberikan pakan berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%. Berat makanan 40 gram.
6. Makanan dan minuman diberikan setiap hari secukupnya.
7. Alas sekam diganti tiga hari sekali untuk menjaga kebersihan kandang dan tikus dengan ketebalan secukupnya.
8. Tikus disuntikkan CCl_4 intraperitoneal dosis 1 ml/kgBB 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 diberikan perlakuan seperti penimbangan berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida (CCl_4). 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.
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 kepada pada kelompok K-positif, KP-2, KK-2, KP-5, KK-5, KP-9, KK-9 dengan injeksi CCl_4 dosis 1 ml/kgBB secara intraperitoneal. Berat badan tikus ditimbang sebelum induksi fibrosis hati untuk menentukan dosis CCl_4 yang akan diberikan. Injeksi diberikan dua kali seminggu.

4. Injeksi CCl_4 dilakukan 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, 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 putih (*Rattus norvegicus*) strain 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 stres.
2. Perlakuan terhadap tikus seperti, pengukuran berat badan dan pemberian karbon tetraklorida (CCl_4) dilakukan pada pagi hari pukul 10.00 karena tikus binatang yang aktif ketika malam hari hingga pagi hari.
3. Pembedahan dilakukan setelah tikus dikorbankan dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB. Teknik pembedahan dilakukan menurut prosedur tetap pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah :
 - Tikus korbankan dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB
 - 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 hati)
- Lemak yang menempel pada organ dibersihkan
- Organ dicuci dengan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah
- Organ kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% secara berulang
- 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.

4.7.1.4 Rasa nyeri

1. Nyeri akan timbul akibat injeksi karbon tetraklorida (CCl_4) melalui intraperitoneal. Tikus yang telah diinjeksikan dimasukkan kembali ke kandang.

2. 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 serta mudah diakses oleh hewan coba. Keberhasilan dalam mengatasi nyeri dinilai dari aktivitas hewan, kebiasaan hewan seperti mengeliat, asupan makanan, air, dan agresivitas saat diberikan perlakuan.

4.7.1.5 Bahaya potensial

Dapat terjadi selama pemeliharaan dan cara pencegahan yang dilakukan, yaitu:

1. Perlakuan terhadap hewan seperti penyuntikan karbon tetraklorida (CCl_4) dapat menimbulkan stres pada tikus. Untuk itu dilakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
2. Infeksi yang dapat terjadi akibat penyuntikan karbon tetraklorida (CCl_4) 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 Karbon Tetraklorida (CCl_4)

1. Mengambil CCl_4 dengan pipet ukur sebanyak 5 ml/hari.

2. Melarutkan CCl_4 dengan minyak jagung sebanyak 1:1 di dalam *beaker glass*, yaitu untuk CCl_4 sebanyak 5 cc dan minyak jagung dengan konsentrasi 50%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.
3. Pengambilan larutan CCl_4 dengan dosis 1 ml/kgBB.
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Penginduksian CCl_4 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 Kurkumin (kemurnian > 94%) yang dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, U.S.A) dengan pelarut CMC Na 1%. Untuk membuat suspensi kurkumin, pelarut yang digunakan adalah CMC Na 1%. Perlakuan diberikan secara oral melalui sonde dengan dosis 200 mg/KgBB/hari.

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan untuk mendapatkan semua derajat fibrosis hati dan sirosis.
2. Tikus dianestesi terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 50 mg/kgBB.
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.
5. Dilakukan pengambilan organ hati tikus.
6. Tikus dikuburkan di dalam satu lubang sejauh setengah meter, dikerjakan oleh pihak Laboratorium Farmakologi.

4.7.5 Pengukuran Ekspresi IL-17 Jaringan Hati

1. Pengukuran ekspresi IL-17 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 didefarafinisasi 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 dH₂O sebanyak dua kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) selama 5 menit.
3. Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam glass box yang berisi citrate buffer kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit untuk dioptimalkan antigenicitynya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan sebentar, jaringan diberi batas dengan menggunakan pap pen. Sediaan dicuci dengan dH₂O

selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0,3% selama 15 menit.

4. Setelah endogenous peroksidasinya diblok, sediaan diinkubasi dengan blocking solution selama 30 menit untuk memblokir avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi selama 2 jam pada suhu -4°C dengan primer antibodi yang diencerkan dengan perbandingan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak tiga kali dengan dH_2O sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing-masing selama 90 dan 60 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzidine 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.
5. 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.
6. Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan deg glass. Hasil dari pemeriksaan imunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarnai dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat imunostaining inti dan lebih dari 5% sel tumor positif pewarnaan. Evaluasi imunohistokimia ini akan dilakukan secara individual oleh konsulen patologi dan peneliti untuk mendapatkan hasil yang akurat.

4.7.6 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

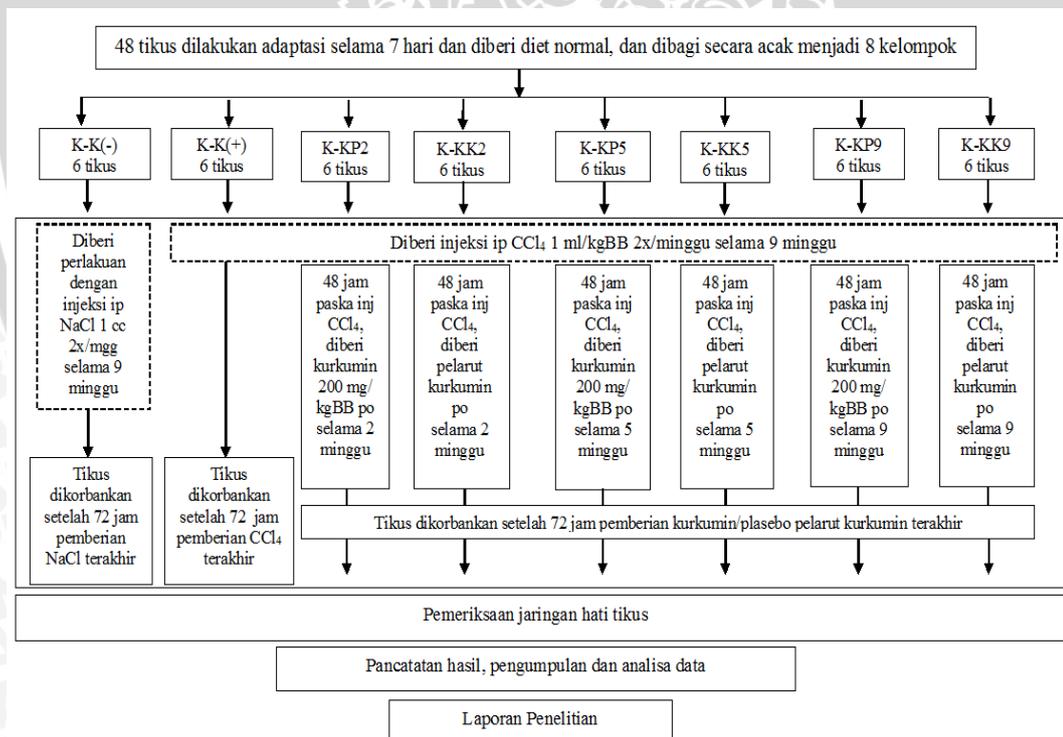
Pertama, dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18 - 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan dari fiksasi adalah untuk 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 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 60°C) 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 mikron *rotatory* atau *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 Hematoksilin 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 hematoksilin 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* atau *canada balsam*. Eosin akan memberikan warna merah pada membran sel, sedangkan hematoksilin 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.

4.7.6 Bagan Alur Penelitian

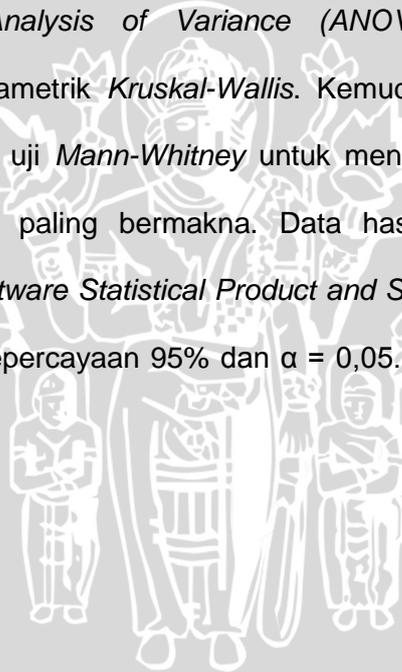


Gambar 4.2 Bagan Alur Penelitian

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 $p = 0,05$.

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 *LSD* 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 $p < 0,05$.



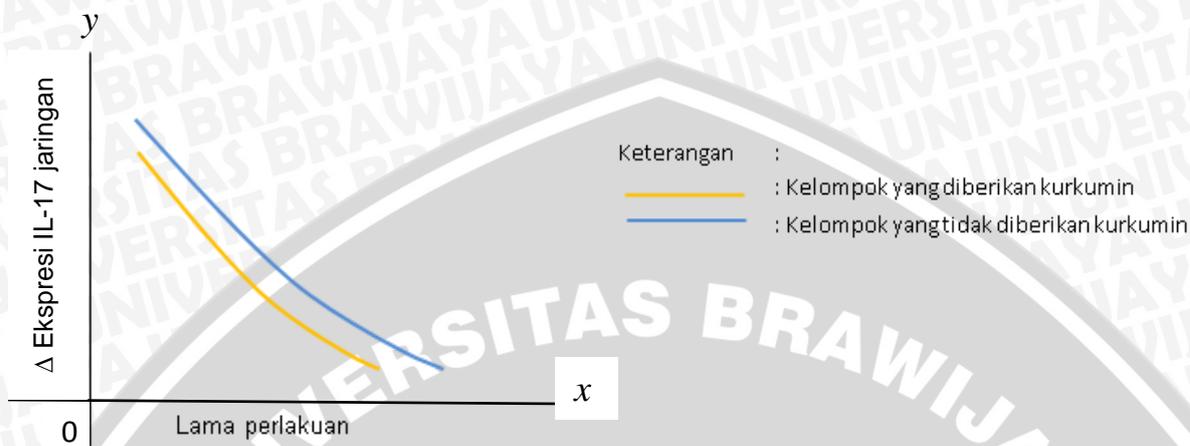
4.9 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

1. Pelaporan hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Tabel 4.2 Ekspresi IL-17 jaringan hati pada masing-masing tikus

| Perlakuan | Tikus | Ekspresi IL-17 Jaringan Hati (%) | Mean Ekspresi IL-17 Jaringan Hati (%) \pm SD | Derajat Fibrosis Hati |
|---|-------|----------------------------------|--|-----------------------|
| K-Negatif Diinjeksi NaCl 1 cc 2x/minggu selama 9 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| K-Positif Diinjeksi CCl ₄ 1 ml 2x/minggu selama 9 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KP-2 Diberikan kurkumin 200 mg/kgBB selama 2 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KK-2 Diberikan pelarut kurkumin selama 2 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KP-5 Diberikan kurkumin 200 mg/kgBB selama 5 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KK-5 Diberikan pelarut kurkumin selama 5 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KP-9 Diberikan kurkumin 200 mg/kgBB selama 9 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| KK-9 Diberikan pelarut kurkumin selama 9 minggu | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

2. Grafik korelasi antara lama pemberian kurkumin dan ekspresi IL-17 jaringan yang diharapkan



Gambar 4.3 Grafik korelasi yang diharapkan

