

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2011 sampai dengan bulan Februari 2012. Pembuatan hewan model dan pemeliharaannya dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pemeriksaan kadar SGOT, SGPT, serum bilirubin direk, serum bilirubin indirek dan serum bilirubin total dilakukan di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Hewan Penelitian

Hewan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* sebanyak 27 ekor berumur 2,5 bulan dengan berat badan antara 150-200 gram. Tikus putih yang akan digunakan sebagai hewan percobaan dalam kondisi sehat.

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *surgical set*, spuit 3 cc, spuit 5 cc, spuit tuberkulin, meja operasi, bak plastik, *gloves*, *nierbekken*, doek steril, kandang pemulihan, tempat pakan dan minum, kertas label, sentrifuge, kasa hydrophil, hypafix, spektrofotometer hitachi-boehringer mannheim 4020, sonde lambung, benang jahit *dexon 3/0*, *prolene 3/0* dan *prolene 7/0*.

3.2.3 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak buah delima terstandart yang mengandung 40% *ellagic acid* diproduksi oleh Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (Room 1-1111, High-tech Venture Park, No 69 Jinye Road, Gaoxin Distric of Xi'an, People of Republic of China), *sodium carboxy methyl cellulose* (CMC) Na 0,3%, diazepam, ketamine HCl, serum darah, pereaksi SGOT, pereaksi SGPT, pereaksi bilirubin direk, pereaksi bilirubin total, alkohol, aquades, betadine dan antibiotik profilaktik.

3.2.4 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum darah dari 27 ekor tikus putih (*Rattus norvergicus*) dengan masing-masing perlakuan sebanyak sembilan ulangan.

3.2.5 Variabel penelitian

Dalam penelitian ini variabel yang digunakan meliputi :

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *sodium* CMC Na 0,3% dan ekstrak buah delima terhadap hewan percobaan.
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar SGOT, SGPT, serum bilirubin direk, serum bilirubin indirek dan serum bilirubin total.
3. Variabel terkontrol adalah jenis hewan percobaan, umur hewan percobaan, berat badan percobaan, tatalaksana pemeliharaan dan prosedur pembuatan hewan model.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Sediaan Uji

Ekstrak buah delima yang akan diberikan pada hewan percobaan disuspensikan dalam *sodium* CMC Na 0,3% (Palanysamy *et al.*, 2007) di dalam mortar agar homogenitas larutan dapat dijaga. Sediaan juga selalu dibuat baru sebelum diberikan. Pembuatan *sodium* CMC Na 0,3% dilakukan dengan cara menaburkan *sodium* CMC Na 0,3 gram dalam 100 ml aquades hangat.

3.3.2 Persiapan dan Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Tikus putih yang akan digunakan sebagai hewan model fibrosis hati diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu. Setelah itu diberi antibiotik profilaktik sebelum dilakukan operasi dengan dosis 20 mg/kg BB/intra muskular dan dianestesi dengan kombinasi ketamine HCl dan diazepam (50 mg : 50 mg, dengan dosis 0,6 mg/kg BB/intra muskular). Desinfeksi dilakukan pada daerah *midline* abdominal tikus putih dengan betadine, tikus diletakkan rebah dorsal dengan posisi ekor mengarah ke operator. Insisi dilakukan pada *midline* abdomen sepanjang kurang lebih setengah dari jarak antara bagian abdomen posterior dengan *cartilago xyphoideus*.

Pada saluran empedu yang terletak 0,5 – 1 cm dari dinding duodenum, dibuat dua ligasi dengan jarak kurang lebih 0,3 cm menggunakan *prolene* 7/0. Bagian yang terletak diantara dua ligasi dipotong untuk mendapatkan kondisi obstruksi total pada saluran empedu. Selanjutnya saluran empedu yang telah terikat dan terpotong dikembalikan ke dalam rongga abdomen. Muskulus dan

kulit abdomen yang telah diinsisi ditutup kembali dengan jahitan terputus menggunakan *dexon 3/0* dan *prolene 3/0* (Brandoni and Tores, 2009).

Perlakuan terhadap hewan coba diawali dengan penentuan dosis dan lama pemberian ekstrak buah delima. Dosis ekstrak buah delima yang digunakan pada penelitian ini adalah 150 mg/kg BB/p.o/hari. Teknik BDL mengakibatkan hewan model mulai muncul jaringan-jaringan fibrous pada area periportal dua hari setelah BDL (Beaussier *et al.*, 2007). Sel hati mulai mengalami degenerasi setelah tiga minggu masa BDL dan terjadi perubahan pada daerah septa disertai ruang antara sinusoid hati yang semakin renggang, tidak beraturan dan terbentuk jaringan fibrosis di sebagian besar dari hati. Kondisi sirosis ini akan semakin meluas setelah empat minggu masa BDL (Pambudi, 2004). Berdasarkan kenyataan tersebut, untuk mengetahui kemampuan ekstrak buah delima terhadap perbaikan fungsi hati tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model fibrosis hati, maka ekstrak buah delima diberikan dua hari setelah BDL sebanyak satu kali dalam sehari selama 21 hari sesuai dengan kelompok perlakuan.

3.3.3 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Sejumlah 27 ekor hewan percobaan selama waktu adaptasi dan selama penelitian berlangsung diberi makan dan minum secara tak terbatas (*ad libitum*). Sebelum perlakuan dimulai keseluruhan hewan percobaan dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan dengan masing-masing terdiri dari sembilan ekor tikus.

1. P0 : Kontrol negatif, tikus putih yang dilakukan laparotomi tanpa pemberian ekstrak buah delima dan *sodium* CMC Na 0,3% yang diobservasi 21 hari setelah dilakukan laparotomi.
2. P1 : Kontrol positif, tikus putih yang dilakukan teknik BDL dengan pemberian *sodium* CMC Na 0,3% yang diobservasi 21 hari setelah perlakuan.
3. P2 : Tikus putih yang dilakukan teknik BDL dengan pemberian ekstrak buah delima dan *sodium* CMC Na 0,3% yang diobservasi 21 hari setelah perlakuan.

3.3.4 Pengambilan Sampel

Sampel darah diambil 24 jam setelah perlakuan terakhir. Sebelum melakukan pengambilan sampel darah, tikus dianestesi terlebih dahulu dengan menggunakan eter. Sampel darah diambil secara intrakardial yang sebelumnya sudah dilakukan insisi pada daerah thorak tikus, tetapi dengan keadaan jantung masih berdenyut. Darah yang diambil sebanyak kurang lebih 3 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa diberi antikogulan yang kemudian ditutup dengan sumbat karet. Setelah itu darah tersebut diperiksa ke Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

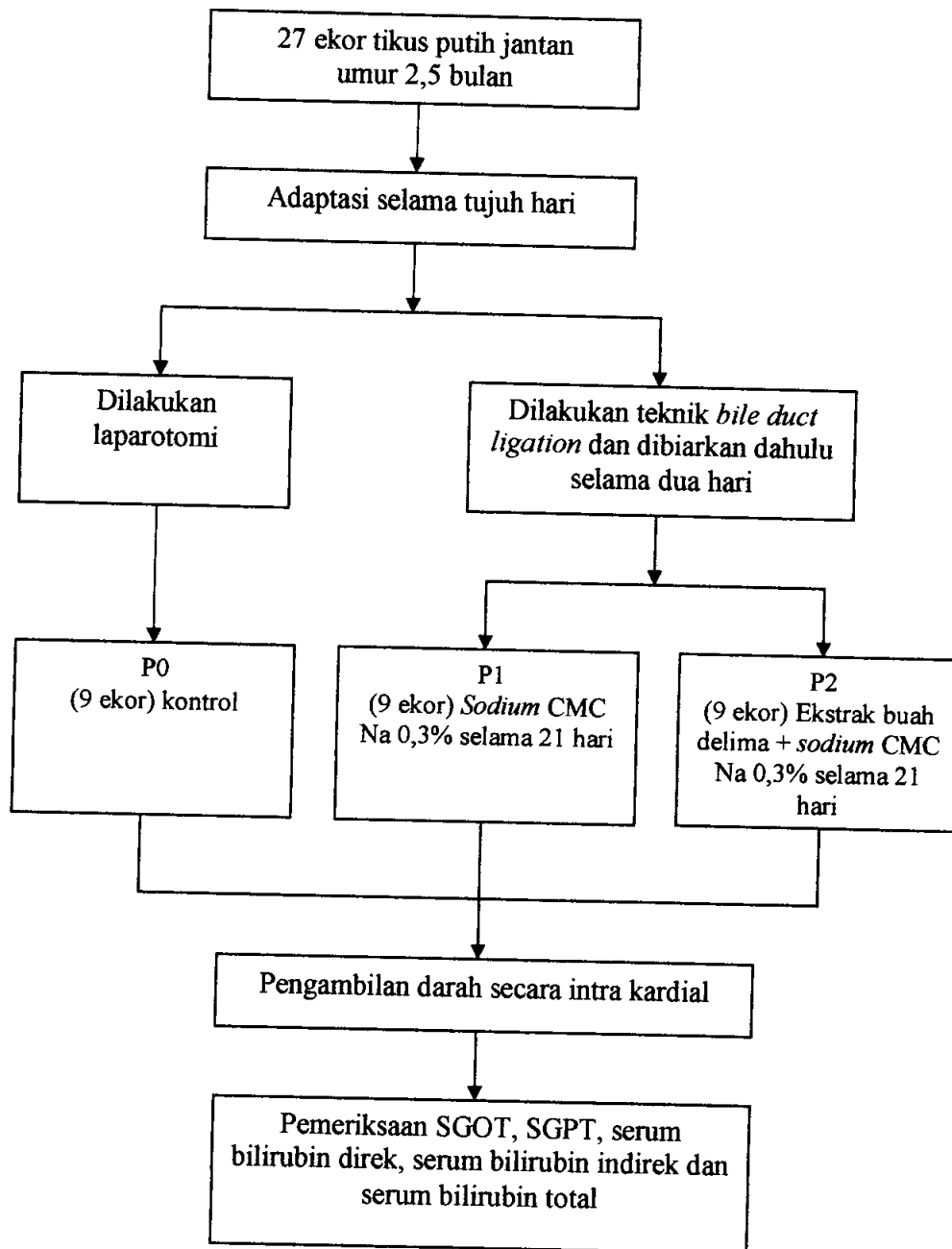
3.3.5 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah *post tested only control group designed* yang dirancang menggunakan bentuk Rancangan Acak Lengkap (Kusriningrum, 2008).

3.3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diuji kenormalannya, apabila berdistribusi normal maka dianalisis dengan menggunakan uji *Analysis Of Variance* (ANOVA). Hasil dinyatakan signifikan jika $p < 0,05$. Adanya perbedaan yang nyata diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% untuk mengetahui perlakuan mana yang menyebabkan perubahan paling besar pada kadar SGOT, SGPT, bilirubin direk, bilirubin indirek dan bilirubin total (Kusriningrum, 2008). Data yang diperoleh dari semua kelompok sampel diolah dengan menggunakan program *SPSS 18 for Windows*.

3.4 Diagram Alur Penelitian



Gambar 3.1. Diagram alur penelitian