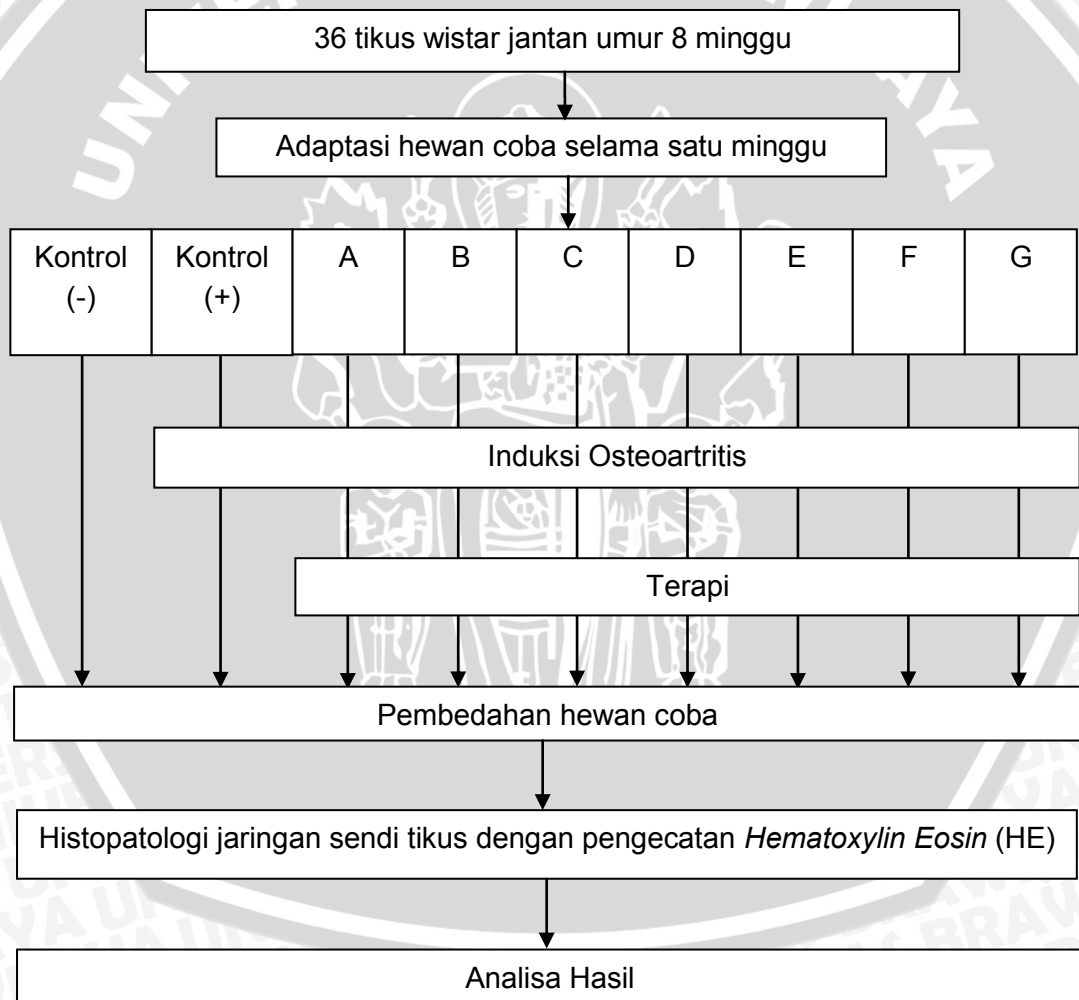


BAB 4
METODE PENELITIAN

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*.



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian



4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan berusia 7-8 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Tikus wistar yang diinduksi osteoarthritis dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2013):

$$p(n-1) > 15$$

p : jumlah perlakuan

n : jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 9 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$9(n-1) > 15$$

$$n-1 > 15:9$$

$$n > 2.67$$

jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 3

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penginduksian CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan pemberian terapi *fucoidan* dari *Sargassum sp*, kombinasi terapi *fucoidan* dan steroid, serta steroid yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok Kontrol Negatif: tikus tidak diinduksi CFA dan tidak diberikan terapi
2. Kelompok Kontrol Positif: tikus diinduksi CFA dan tidak diberikan terapi
3. Kelompok 1 (A): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 20mg/KgBB
4. Kelompok 2 (B): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 40mg/KgBB

5. Kelompok 3 (C): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 80mg/KgBB
6. Kelompok 4 (D): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB
7. Kelompok 5 (E): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 20mg/KgBB
8. Kelompok 6 (F): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 40mg/KgBB
9. Kelompok 7 (G): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 80mg/KgBB

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah gambaran histopatologi jaringan sendi tikus model osteoarthritis.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmako Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Teknologi Hasil Pangan Universitas Brawijaya.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan dari bulan Maret hingga Juli 2014.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Ekstraksi *Fucoidan* dari *Sargassum sp.*

Alat dan bahan: Tabung gelas 500 ml, stirer, tabung erlenmeyer, *whatman filter papers* (90 mm GF/D), *alumunium foil*, larutan MeOH-CHCl₃-H₂O(4:2:1), bubuk sargassum 25 g, *aquades*, *ultrasonic extraction*, *waterbath*, neraca analitik, serat nylon, larutan 0.03 m HCL, *refrigerator* 4°C, larutan CaCl₂, *centrifuge* 8500 rpm 4°C, *tube centrifuge*, corong, dan etanol absolut

4.5.2 Perawatan Tikus

Alat dan bahan: bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 9 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 9 buah, botol air 18 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

4.5.3 Induksi Osteoarthritis

Alat dan bahan: *Complete Freund Adjuvant* (CFA), spuit 1cc.

4.5.4 Pemberian Terapi

Alat dan bahan: spuit 1 cc, kapas alkohol, *fucoidan*, dexamethason injeksi

4.5.5 Pembedahan Tikus

Alat dan bahan : gunting bedah², Pinset 2, Jarum pentul 2 set, Steroform 2, Kapas, Kloroform 20 ml, Alkohol, Wadah plastik+tutup 36 buah, Spuit insulin 1 ml

4.5.6 Pembuatan Slide Histopatologi Jaringan Sendi Tumit Tikus dengan Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE)

Alat dan bahan : incubator, object glass, cover glass, mikrotom, pinset, dan *Automatic Tissue Processing*, formalin 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, parafin, alkohol 70%, dan Hematoksilin-Eosin (HE).

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8 minggu yang dibeli dari laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- CFA: CFA adalah *Complete Freund's Adjuvant* yang berisi bakteri *mycobacterium tuberculosis* yang dilemahkan untuk menginduksi kondisi osteoarthritis pada hewan coba. CFA yang digunakan merupakan produksi Sigma.
- *Fucoidan*: Hasil ekstraksi *fucoidan* dari rumput laut coklat (*Sargassum sp.*) dengan metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian Sugiono pada tahun 2014.
- Steroid: Steroid yang digunakan adalah jenis steroid injeksi dexamethason.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi *Fucoidan* dari *Sargassum sp.*

Alga (*Sargassum sp.*) bubuk dicampur dengan larutan MeOH-CHCl₃-H₂O (4:2:1). Alga dilarutkan dengan 0.03 M HCl (1:20 w/v) kemudian didegradasi menggunakan *ultrasonic extraction* (amplitudo 80%, 15 menit). Larutan kemudian diekstraksi menggunakan *waterbath* pada suhu 70-90°C selama 3-5 jam. Suspensi yang dihasilkan difiltrasi menggunakan serat nylon untuk memisahkan residual alga. Ekstrak kemudian dipresipitasi menggunakan 1 M CaCl₂ pada suhu 4°C semalaman. Larutan difiltrasi kemudian dicampurkan dengan etanol absolut (3 volume) pada suhu 4°C selama 8 jam. Ekstrak kemudian dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) pada suhu 4°C. Hasil ekstraksi murni *fucoidan* diuji dengan menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) untuk melihat gugus yang ada (Sugiono *et al.*, 2014).

4.7.2 Perawatan Tikus

Tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan aklimatisasi tikus dan ditimbang berat badan sebelum penelitian dengan neraca sartorius. Tikus diberikan diet normal dan diberi minum satu kali sehari. Sekam diganti dua kali seminggu. dan tikus ditimbang setiap minggunya.

4.7.3 Induksi Osteoarthritis

Induksi osteoarthritis dilakukan dengan injeksi CFA intraartikular pada sendi tumit kanan tikus. Injeksi dilakukan 3 kali, yaitu injeksi pertama sebanyak 125 μ l diikuti 2 kali injeksi booster setengah dosis dengan interval 2 minggu (Koo, 2013).

4.7.4 Pemberian Terapi

Injeksi terapi *fucoidan*, steroid dan kombinasi steroid/*fucoidan* intraartikular menggunakan spuit 1 cc pada tumit kanan tikus setiap 1 minggu sekali sebanyak 2 kali.

4.7.5 Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Kemudian tikus difiksasi diatas steroform, lalu dibedah. Bagian kaki hingga lutut dipotong untuk mengambil sampel jaringan sendi tumit untuk pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan hematoxililn eosin (HE).

4.7.6 Pembuatan Slide Histopatologi Jaringan Sendi Tumit Tikus dengan Pengecatan Hematoxililn Eosin (HE)

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan metode paraffin.

Fiksasi dilakukan dengan formalin 10% selama 24 jam kemudian dicuci menggunakan air minimal 1,5 jam. Jaringan dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alkohol absolut selama 2x1 jam lalu dalam campuran xylo : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylo PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong setipis mungkin dan dimasukkan ke dalam *melted* paraffin : xylen = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam. *Melted* paraffin dimasukkan ke dalam cetakan kemudian blok paraffin dibiarkan dingin. Jaringan pada blok paraffin dipotong menggunakan mikrotom kemudian diletakkan pada gelas objek yang telah dilapisi dengan lapisan putih telur : gliserol = 1:1 sebagai lapisan tipis dan biarkan kering. Jaringan yang berada di gelas objek dimasukkan ke dalam xylo selama 3x5 menit lalu dikeringkan. Hasil pengecatan diamati pada mikroskop.

4.8 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya. Analisis data dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Dilakukan uji *One-Way Anova* jika sebaran data normal dan uji nonparametrik (uji *Kruskal-Wallis*) jika sebaran data tidak normal. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan menggunakan program *SPSS for Windows XP*, dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).