

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk membuat suatu standar hewan coba lupus menggunakan mencit BALB/c yang diinduksi oleh pristane.

4.2 Populasi dan Jumlah

Sampel dari penelitian ini adalah mencit betina strain BALB/c sejumlah 20 ekor. Mencit betina dipilih dikarenakan prevalensi penyakit lupus banyak pada populasi wanita dibandingkan pria. Penelitian ini dilaksanakan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Tabel 4.1 Kriteria Inklusi dan Ekskusi Mencit Penelitian

Kriteria inklusi	Kriteri Ekskusi
Mencit strain Balb/c betina	Mencit yang selama penelitian tidak mau makan dan bulu rontok
Mencit sehat dan bergerak aktif	Mencit tidak aktif bergerak
Umur 6-8 minggu	
Berat badan rata-rata 25-30 gram	



Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah satu perlakuan yaitu injeksi pristane 0.5 ml intraperitoneal. Namun hewan coba dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan waktu analisis dan lamanya paparan pristane. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Tikus Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	Tidak diberikan perlakuan apapun
Kelompok A	Induksi Pristane yang dianalisis pada minggu ke-8
Kelompok B	Induksi Pristane yang dianalisis pada minggu ke-16
Kelompok C	Induksi Pristane yang dianalisis pada minggu ke-24
Kelompok D	Induksi Pristane yang dianalisis pada minggu ke-32

Estimasi Jumlah Sampel Penelitian

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

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

n : jumlah ulangan

p : jumlah perlakuan

Pada penelitian ini terdapat lima macam perlakuan, yaitu kelompok kontrol positif yang merupakan mencit yang diinduksi oleh pristane yang dianalisis pada

minggu ke-8, minggu ke-16, minggu ke-24, minggu ke-32 dan kelompok kontrol sehat yang merupakan mencit yang tidak diinduksi oleh pristane, sehingga didapatkan jumlah sampel sebagai berikut :

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

$$n(5 - 1) \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 3,75 \text{ dibulatkan keatas menjadi } 4$$

Untuk 5 perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak empat kali. Maka total mencit yang dipakai menjadi 20 ekor mencit BALB/c.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian pristane pada mencit Balb/c betina sebanyak 0,5 mL secara intraperitoneal. Dilakukan pembagian mencit menjadi dua kelompok yaitu, kelompok kontrol (tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan (diinduksi pristane). Kelompok perlakuan dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan lama waktu induksi, yaitu: kelompok perlakuan induksi pristane hingga minggu ke-8, minggu ke-16, minggu ke-24, dan minggu ke-32.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah presentase T-Reg pada mencit Balb/c yang diinduksi pristane.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi untuk memberikan perlakuan pada mencit dan Laboratorium Biomedik untuk pembacaan flowsitometri Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni 2014 sampai bulan Maret 2015.

4.5 Definisi Operasional

1. Penelitian ini menggunakan mencit BALB/c betina diperoleh dari Lembaga Pusvetma Surabaya.
2. Mencit model lupus dibuat dengan cara induksi pristane (*Sigma Aldrich* no.catalog p2870-100ML) sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal di daerah inguinal mencit (Cui, *et al.*,2006). Induksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan terhadap proteinuria dan kadar ANA pada mencit untuk memastikan diagnosis LES. Mencit yang digunakan sebagai kontrol negatif diinduksi *phosphate buffer saline* (PBS) (Chowdhary, *et al.*, 2007).
3. Deteksi lupus dengan ANA-test (ELISA kit Mybiosource, USA, katalog MBS9302408) (Cui, *et al.*,2006).
4. Deteksi Proteinuria dilakukan menggunakan metode *Boiling and Acetic Acid test* (Schrier,2007). Urine ditampung dalam wadah kemudian diberi tetesan asam asetat 5% sebanyak 3-5 tetes lalu dipanaskan hingga 5 menit. Hasil pengamatan terhadap *Boiling and Acetic Acid test* yaitu, 0: jernih, +1: sedikit keruh (0,01-0,05 gr/dl), +2: keruh dan terdapat sedikit gelembung udara (0,05-0,2 gr/dl), +3: keruh dan terdapat kepingan endapan (0,2-0,5 gr/dl), +4: sangat keruh dan endapan terlihat jelas (>0,5 gr/l) (Simerville,2005).

5. Pengukuran presentase sel Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas kedokteran. Presentase sel Treg diukur dengan cara flowsitometri dengan reagen penanda antibodi CD4 (FITC) (Biolegend), CD25 (PerCP)(Biolegend), dan FOXP3 (PE)(Biolegend).
6. Setelah induksi pristane mencit dikorbkan pada ke-8, minggu ke-16, minggu ke-24, dan minggu ke-32 berdasarkan studi yang dilakukan oleh Chowdhary, *et al.*, (2007)

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

- Induksi mencit BALB/c model LES: Pristane (*Sigma Aldrich* no.catalog p2870-100ML) 0,5ml
- Alat yang digunakan untuk flowsitometri: FACS Caliber tube
- Bahan yang digunakan untuk flowsitometri: Cairan CSB (Biolegend), Antibodi CD4 (FITC)(Biolegend), CD25 (PerCP) Staining buffer (Biolegend), FOXP3 (PE) (Biolegend), fix *buffer* (Biolegend), Perm *buffer* (Biolegend)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih betina strain BALB/c yang berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit diadaptasi di laboratorium Farmakologi selama tujuh hari sebelum dilakukan perlakuan. Setiap hari, mencit diberi makan 200gr dan minum serta ditempatkan di dalam kandang yang bersih. Studi ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pemberian Perlakuan Pristane

Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu mencit yang diinjeksikan pristane dan mencit yang tidak diinjeksikan pristane sebagai kontrol. Pristane (*Sigma Aldrich* no.catalog p2870-100ML) diinjeksikan sebanyak 0.5 ml secara intraperitoneal. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit (Chowdhary, *et al.*, 2007).

Cara pemberian pristane adalah sebagai berikut :

Mencit diposisikan menghadap kearah frontal sehingga terlihat abdomennya, selanjutnya bagian atas abdomen disterilkan dengan alkohol 70%. Spuit dimasukkan ke bagian abdomen mencit hingga dirasa sudah mencapai intraperitoneal. Pastikan tidak ada darah dalam spuit.

a. Pemeriksaan Proteinuria

Mencit diletakkan dalam wadah yang sudah didesign untuk membuat menampung urine mencit. Ditunggu selama 2 jam agar urine tertampung. Kemudian, urine dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditetesi dengan 3-5 tetes asam asetat 5%. Tabung reaksi dipanaskan hingga mendidih diatas bunsen. Lakukan pengamatan perubahan warna jernih hingga keruh dan amati terbentuk endapan pada tabung reaksi.

b. Preparasi Serum

Mencit dimasukkan dalam wadah berisi kapas yang sudah diberi klorofoam. Setelah dalam kondisi pingsan, jarum sonde ditusukkan pada telapak kaki dan tangan mencit. Pembedahan dimulai dari dada secara melintang menggunakan gunting dengan posisi mata tumpul ke dalam. Diambil

darah dari jantung mencit menggunakan spuit 1cc lalu dimasukkan dalam vacutainer berisi EDTA. Selanjutnya vacutainer disentrifugasi dalam 3000rpm selama 5 menit, serum dipipeting dan dipindahkan ke ependorf.

c. Pengukuran kadar ANA

Pemeriksaan ANA pada semua mencit dilakukan dengan metode ELISA (Mybiosource, USA, katalog MBS9302408). Sampel berasal dari darah jantung mencit kemudian lakukan *pipeting* 100 μ l sampel untuk didilusi. Sampel yang sudah didilusi kemudian diletakkan pada *plate*, tambahkan 50 μ l *Biotin-conjugated. Coating* permukaan *plate* lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan dengan kecepatan 400 rpm. *Washing plate* sebanyak 5 kali dengan *wash buffer* kemudian tambahkan 100 μ l Streptavidin-HRP dan lapis permukaan. Inkubasi kembali setelah itu *washing plate* sebanyak 5 kali. Tambahkan 100 μ l *TMB Substrate Solution* lalu inkubasi selama 30 menit. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* dan dibaca pada panjang gelombang 450nm.

d. Isolasi dan Homogenasi Jaringan Limpa

Limpa diisolasi dan dimasukkan dalam *petridish* yang sudah mengandung PBS. Kemudian, homogenasi limpa menggunakan *plunger* sampai dengan terhomogenasi sempurna. Hasil homogenasi difilter menggunakan *cell stainer* lalu disentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit, dibuang *supernatannya*. Ditambahkan ionomicin 2,5 μ l dan PMA 12,5 μ l dan diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator dalam suhu 37^o C. Setelah diinkubasi, dilakukan sentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit kemudian ditambahkan 250 μ l CSB. Kemudian, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 3 menit dan ditambahkan dan 50 μ l *FITC anti-mouse CD4*

Antibody dan antibodi *PerCP anti-mouse CD25 Antibody*. Setelah pemberian antibodi, diinkubasi selama 20 menit pada 4°C dan diberikan Fix Perm Buffer 250 µl, dilanjutkan dengan sentrifugasi, kemudian diberikan Perm Buffer 250µl. Disentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit dan ditambahkan antibodi PE anti-mouse FOXP3 Antibody, inkubasi selama 20 menit pada 4°C lalu sentrifugasi 1200rpm selama 3 menit, ditambahkan CSB 300 µl lalu pindahkan ke dalam tabung *flowcytometer* untuk *dirunning*.

4.7.3 Pengukuran Persentase sel Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3

Pengukuran persentase sel Treg dilakukan menggunakan flowsitometri dengan pewarnaan FITC anti-mouse CD4 antibody (Biolegend), PerCP anti-mouse FOXP3 antibody (Biolegend). Hasil yang diperoleh berupa (%) sel yang mengekspresikan CD4⁺CD25⁺FOXP3 dan diukur dalam 10.000 sel limfosit

4.8 Analisis Data

Data dianalisis yang diperoleh dalam bentuk persentase sel Treg. Data dianalisis dengan cara membandingkan setiap periode waktu dan antar perlakuan. Uji perbandingan dilakukan dengan uji ANOVA. Data disajikan dalam bentuk rerata ± Standar Deviasi (SD) dalam diagram batang. Analisa data menggunakan program *SPSS 16 for Windows*. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan perubahan nilai yang bermakna.

4.9 Alur Penelitian

