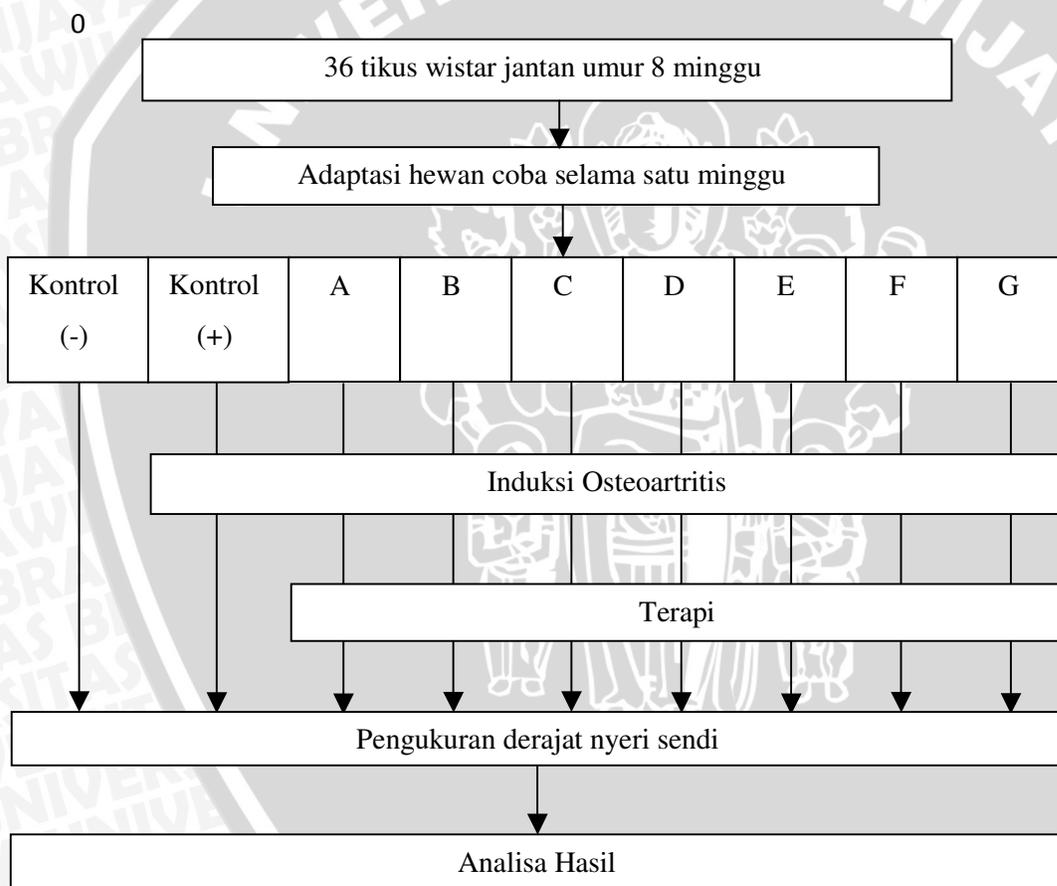


BAB IV METODE PENELITIAN

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

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diinduksi osteoarthritis dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2003):

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

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 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 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.

4.3.2 Waktu Penelitian

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

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penginduksian CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan pemberian terapi *fucoïdan* dari *Sargassum sp*, kombinasi terapi *fucoïdan* 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 *fucoïdan* 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 kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 20mg/KgBB
7. Kelompok 5 (E): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 40mg/KgBB
8. Kelompok 6 (F): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 80mg/KgBB
9. Kelompok 7 (G): tikus diinduksi CFA dan diberi terapi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB

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

4.5 Definisi Istilah/Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikuswistar (*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.

4.5.1 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

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.6.1 Ekstraksi *Fucoidan* dari *Sargassum sp.*

1. Tabung gelas 500 ml,
2. *Stirer*,
3. Tabung erlenmeyer,
4. *Whatman filter papers* (90 mm GF/D),
5. *Alumunium foil*,
6. Larutan MeOH-CHCl₃-H₂O(4:2:1),
7. Bubuk *Sargassum* yang telah digiling sebanyak 25 g,
8. *Aquades*,
9. *Ultrasonic extraction*,
10. *Waterbath*,

11. Neraca analitik,
12. Serat nylon,
13. Larutan 0.03 m HCl,
14. *Refrigerator* 4°C,
15. Larutan CaCl₂,
16. *Centrifuge* 8500 rpm 4°C,
17. *Tube centrifuge*,
18. Corong,
19. Etanol absolut, dan
20. *Handschoon*.

4.6.2 Perawatan tikus

1. Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 9 buah,
2. Tutup kandang terbuat dari kawat 9 buah,
3. Botol air 18 buah,
4. Sekam 6 karung,
5. Timbangan berat badan dengan neraca Sartorius,
6. Makanan dari bahan dasar pellet, dan
7. *Handschoon*.

4.6.3 Induksi Osteoarthritis

1. *Complete Freud Adjuvant* (CFA),
2. Spuit 1cc, dan
3. *Handschoon*.

4.6.4 Pemberian Terapi

1. Dexamethason injeksi,

2. Fucoidan
3. Spuit 1 cc,
4. Kapas alkohol, dan
5. *Handschoon*

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 *ultasonic 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, 2014).

4.7.2 Induksi Osteoarthritis

Induksi osteoarthritis dilakukan dengan injeksi CFA intraartikular pada sendi tumit kanan tikus. Injeksi dilakukan 3 kali, yaitu injeksi pertama sebanyak 125 µl diikuti 2 kali injeksi boster setengah dosis dengan interval 2 minggu. Respon nyeri dan diameter sendi dievaluasi setiap minggu (Koo, 2013).

4.7.3 Pemberian terapi

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

4.7.4 Pengukuran derajat nyeri tikus

Derajat nyeri tikus diukur setiap minggu dengan menggunakan *hot water tail flick assay*. Variabel dependen adalah waktu yang dibutuhkan tikus untuk mengangkat ekornya dari air panas pada *water bath*. Suhu air dijaga tetap pada 50°C dengan dimonitor menggunakan termometer. Waktu yang dibutuhkan tikus untuk mengangkat ekornya karena stimulus panas diukur dengan menggunakan *stopwatch*. Waktu pengangkatan ekor diukur sebagai rata-rata dari 3 kali pengujian pada air panas dengan interval 30 detik (Khan, 2012).

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 18, dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$)

4.9 Jadwal Kegiatan

No	Kegiatan																
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Tahap Persiapan																	
1.	Mengurus ethical clearance																
2.	Mengurus perijinan laboratorium																
3.	Belanja alat dan bahan penelitian																
4.	Aklimatisasi Tikus																
5.	Pembuatan ekstrak <i>fucoidan</i> dan ekstrak kasar <i>Sargassum sp</i>																
Tahap Pelaksanaan																	
1.	Induksi Osteoarthritis																
2.	Pemberian terapi injeksi intraartikular <i>fucoidan</i> dan ekstrak																