

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *randomized post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk membuat suatu standar hewan coba lupus dalam persentase sel Th2 dengan menggunakan mencit Balb/c yang diinduksi oleh pristane.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah mencit strain Balb/c yang diinduksi oleh pristane untuk menjadi mencit LES yang kemudian diukur beberapa marker kemudian penelitian akan dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogeny sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian eksperimental untuk mencegah terjadinya bias. Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi subjek penelitian

1. Mencit strain Balb/c betina
2. Mencit bewarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal

3. Umur 6-8 minggu
4. Berat badan rata-rata 25-30 gram

Kriteria eksklusi subjek penelitian

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
2. Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan, Sehingga mencit Balb/C betina dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok berdasarkan lamanya paparan pristane. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol	Induksi PBS
Kelompok P1	Induksi Pristanedan dianalisis pada bulan ke- 2
Kelompok P2	Induksi Pristanedan dianalisis pada bulan ke- 4
Kelompok P3	Induksi Pristanedan dianalisis pada bulan ke- 6
Kelompok P4	Induksi Pristanedan dianalisis pada bulan ke- 8

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 (Supranto, 2000) :

$$(t-1) (r-1) > 15$$

t : Jumlah perlakuan

r : jumlah sampel

Pada penelitian ini terdapat lima macam perlakuan, sehingga didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$\begin{aligned}(5-1) (r-1) &> 15 \\ 4 (r-1) &> 15 \\ r-1 &> 3.75 \\ r &> 4.75\end{aligned}$$

$r > 4.75$ dibulatkan keatas menjadi 5

Untuk 5 perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak lima kali. Namun untuk mencegah adanya kehilangan data akibat mati setelah perlakuan maka setiap kelompok mencit ditambahkan dua sampel sehingga masing-masing kelompok didapatkan tujuh mencit, maka total mencit yang dipakai adalah 35 ekor mencit BALB/c.

4.3 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi untuk pemberian perlakuan dan pembedahan sedangkan di Laboratorium Biomedik untuk pengukuran flowsitometri. Penelitian dimulai pada bulan Juni 2014 sampai dengan oktober 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian pristane pada mencit Balb/c betina sebanyak 0,5 mL secara intraperitoneal yang di amati mulai dari bulan ke- 2,4,6,8.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini presentase sel Th2 pada limpa.

4.4.3 Variabel Perancu

Karena suhu ruangan, kemungkinan terkena infeksi, intake makanan, kelembapan kandang yang mana semua itu mengakibatkan perancu atas variabel tergantung yang dihasilkan.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Hewan Coba Mencit Balb/C

Mencit Balb/ C merupakan mencit yang memiliki karakteristik imunologis yang hampir sama dengan manusia (Satoh, *et al.*, 1996; Rottman dan Willis, 2010). Mencit Balb/C ini diperoleh dari Lembaga Pusuetma Surabaya dengan surat keterangan keaslian Balb/C. Adapun kriteria mencit Balb/C yang di beli adalah sebagai berikut:

- Mencit Balb/C betina.
- Berkulit putih mengkilat, sehat, dan aktif.
- Usia 6-8 minggu.
- Bb 25-30 gram.

Setelah mencit datang kemudian dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya. Mencit selanjutnya akan dilakukan aklimatisasi atau pengadaptasian terhadap lingkungan lab selama kurang lebih satu minggu. Kegiatan ini bertujuan untuk mengadaptasikan hewan coba pada kondisi lab sehingga tidak stress saat dilakukan perlakuan.

4.5.2 Lupus Eritematosus Sistemik (LES)

Lupus eritematosus sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun sistemik yang ditandai dengan hilangnya toleransi imunologis dan produksi autoantibodi sehingga mengakibatkan terjadinya manifestasi klinis dan kerusakan multiorgan. LES juga ditandai dengan berkurangnya produksi IL-2 dan hilangnya respon terhadap pembentukan IL-2 yang dapat membantu meningkatkan ekspresi sel T (Mok dan Lau,2003).

4.5.3 Injeksi Pristane

Pristane (TMPD) merupakan suatu senyawa alkana isoprenoid yang ditemukan dalam jumlah kecil pada beberapa tanaman dan dianggap berasal dari phytol, ubiquitous ester dari klorofil. pristane dapat menginduksi mencit normal menjadi mencit yang memiliki manifestasi klinis dan imunologis yang menyerupai LES pada manusia. Pristane diperoleh dari pabrik Santa Cruz, US .pristane ini dalam bentuk tabung yang berisi 100 ml, Kemudian cara pengambilannya menggunakan spuit 1cc setelah itu pristane diinjeksi sebanyak 0,5 ml pada masing masing mencit secara intraperitoneal. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit. Berdasarkan beberapa penelitian injeksi pristane bertujuan untuk menginduksi LES.

4.5.4 Presentase sel Th2 pada Limpa

Staining dilakukan dengan antibodi anti-PE-CD4⁺ yaitu marker dari sel T helper dan anti-PerCP-IL4 marker dari sel Th2. Proses pengukuran persentase sel menggunakan flowsitometri dilakukan sesuai dengan prosedur dari pabrik biolegend.

Pengukuran dilakukan pada 10^5 sel dan hasil didapatkan dalam bentuk persentase sel. Sel Th2 merupakan sel yang mengekspresikan CD4⁺ IL-4.

Pada flowsitometri Pengukuran sel Th2 dilakukan pada region kanan atas pada dot plot yang menunjukkan positif ganda CD4⁺ IL-4.

4.6 Bahan dan Alat / Instrument Penelitian

Alat yang digunakan untuk melakukan pembedahan mencit :

- Gunting bedah
- Pinset
- Jarum pentul
- Strerofom atau papan fiksasi
- Kertas

Bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit :

- Clorofoam atau eter
- Formalin 10%
- Alcohol
- Vacutainer
- S spuit 5cc

4.7 Metode Pengumpulan data

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/c yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Pemilihan mencit Balb/c dikarenakan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/c dapat

memberikan gambaran klinis dan imunologis lupus seperti yang terjadi pada manusia. Mencit Balb/c juga mencit yang sering digunakan sebaagai model hewan coba lupus terinduksi pristane. Selain itu, mencit Balb/c juga merupakan mencit yang memiliki karakteristik imunologis yang hampir mirip dengan manusia (Sato, *et al.*, 1996; Rottman dan Willis, 2010).

Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama tujuh hari. Mencit diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang yang dibersihkan setiap harinya. Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Pemberian Pristane

Pristane yang didapatkan dari pabrik diinjeksikan ke mencit sesuai dengan prosedur yang telah dideskripsikan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu mencit yang diinjeksikan pristane dan mencit yang tidak diinjeksikan pristane sebagai kontrol. Pristane diinjeksikan sebanyak 0.5 ml secara intraperitoneal. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit. Pengambilan sampel untuk pengukuran variabel dilakukan pada bulan ke-2, 4, 6, dan 8 (Chowdhary, *et al.*, 2007).

Cara pemberian pristane adalah sebagai berikut :

- a. Persiapan alat dan bahan meliputi: Sarung tangan karet medis (handscone), spuit 1cc, *alcohol swabs/alcohol 70%*, dan kain steril.
- b. Penentuan dosis pristane berdasarkan penelitian oleh Cui, *et al.* (2006) yaitu 0,5ml dosis tunggal
- c. Mencuci tangan dan memakai sarung tangan

- d. Mencit diposisikan menghadap ke arah frontal sehingga terlihat abdomennya dengan menggunakan kain steril untuk memfiksasi posisi mencit.
- e. Sterilkan bagian atas abdomen mencit dengan menggunakan *alcohol* 70%.
- f. Cubit kulit abdomen hingga terasa bagian ototnya.
- g. Masukkan spuit ke bagian abdomen dan coba gerakkan. Apabila sudah terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal. Tarik sedikit bagian penginjeksi spuit pastikan tidak ada darah yang masuk.
- h. Setelah yakin pada daerah intraperitoneal, injeksikan pristane secara perlahan. Kemudian tarik kembali spuit.
- i. Sterilkan kembali daerah abdomen dengan *alcohol* 70%

4.7.3 Pembedahan Mencit

Proses pembedahan mencit dilakukan di Laboratorium Farmakologi FK UB. Pada bulan ke 2,4,6 dan 8. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimasukkan ke dalam toples yang sudah berisi kapas dan clorofoam /eter.setelah mencit pingsan kemudian mencit diterlentangkan di papan bedah, tangan dan kakinya ditusuk jarum sonde agar tidak bergeser saat proses pembedahan berlangsung.selanjutnya pembedahan dimulai dari dada secara melintang menggunakan gunting dengan posisi mata gunting (tumpul) ke dalam setelah itu gunting organ limpa dan masukkan ke dalam cawan petri yang sudah terisi CSB kemudian setelah limpa mencit diambil maka proses dilanjutkan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas brawijaya untuk dilakukan proses Flowsitometri. Flowsitometri dilakukan untuk mengetahui presentasi sel Th2 pada jaringan limpa.

4.7.4 Pengukuran Persentase Sel Th2 pada Limpa

Pengukuran persentase sel Th2 dari limpa diukur menggunakan metode flowsitometri sesuai standar di Laboratorium Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. limpa mencit diambil pada bulan ke-2, 4, 6, dan 8 untuk mengukur perkembangan setiap waktunya melalui pembedahan.

Staining dilakukan dengan antibodi anti-PE-CD4⁺ dan anti-PerCP-IL4. Proses pengukuran persentase sel menggunakan flowsitometri dilakukan sesuai dengan prosedur dari pabrik biolegend. Pengukuran dilakukan pada 10⁵ sel dan hasil didapatkan dalam bentuk persentase sel. Sel Th2 merupakan sel yang mengekspresikan CD4⁺ IL-4.

Cara pengukuran sel Th2 pada limpa yaitu pertama limpa dilakukan homogenisasi secara halus dan lembut setelah itu di saring menggunakan *cell strainer* setelah itu dibagi dan dimasukkan ke dalam 4 ependof (1200µL) masing masing 300 µL selanjutnya di sentrifuge 2500rpm selama 3 menit dalam 4°C kemudian setelah selesai dilakukan sentrifuge dilanjutkan dengan membuang supernatant dan sisanya tinggal pellet kemudian dilakukan stimulasi dengan PMA (*phorbol myristate acetate*), *ionomycine*, *golgi plug* . setelah itu dilakukan inkubasi selama 4 jam . setelah 4 jam kemudian dilakukan pewarnaan permukaan CD4⁺ dengan menggunakan CSB 250 µl setelah itu dilakukan vortex supaya pellet dan CSB tercampur kemudian dilanjutkan dengan sentrifuge 2500rpm selama 3 menit dalam 4°C setelah itu dibuang supernatan. Kemudian tahap selanjutnya diberikan CSB 50µl + antibody CD4⁺ kemudian diinkubasi selama 15 – 20 menit. Tahap selanjutnya dengan Fix buffer dengan pengulangan 2 kali yang pertama diberikan 250 µl kemudian di vortex selanjutnya dilakukan setrifuge setelah itu buang supernatan. Untuk tahap yang kedua diberikan Fix buffer 250 µl kemudian diinkubasi

selama 15- 20 menit.selanjutnya dilanjutkan dengan Perm ini juga dengan 2 kali pengulangan yang pertama diberikan 250 µl kemudian dilakukan vortex selanjutnya sentrifuge dan buang supernatan. Untuk tahap yang kedua diberikan 50µl ditambahkan antibody IL-4 kemudian diinkubasi selama 15-20 menit . selanjutnya tahapan yang terakhir dengan CSB diberikan 250 µl kemudian dilakukan pembacaan . Pengambilannya dengan cara pippeting dan pengambilan antibody harus dilakukan ditempat yang gelap karena antibody sangat sensitive terhadap cahaya.

4.7.5 Pemeriksaan kadar ANA

Tes *Anti Nuclear Antibody*(ANA) dilakukan untuk menentukan apakah mencit ini sudah dalam kondisi LES. Pemeriksaan ANA pada semua mencit dilakukan dengan metode ELISA(Mybiosource, USA, katalog MBS9302408). Apabila ANA Test Positif, maka selanjutnya dilakukan pemeriksaan klinis LES.

4.7.6 Pengukuran skor Arthritis

Mencit Balb/C yang diinduksi pristane juga dilakukan pemeriksaan secara klinis dengan menggunakan penilaian *arthritis score*. Arthritis merupakan manifestasi klinis terbanyak pada LES. Pengecekan arthritis skor dilaksanakan sebelum pembedahan dengan menilai morfologi pada sendi jari kaki depan dan belakang dan telapak kaki. Sistem skor dengan cara memberi poin 1 jika terdapat ini edema pada masing masing jari, poin 5 jika terdapat inflamasi pada telapak kaki, sehingga dihasilkan skor maksimal 15 poin tiap kaki atau 60 poin setiap mencit jika terjadi inflamasi pada semua sendi dan telapak kaki (Bas, *et.al.*, 2012).

4.8 Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Data diperoleh pada bulan ke-2, 4, 6, dan 8 paska injeksi pristane setelah dilakukan pembedahan pada periode waktu tersebut. Setiap periode akan diambil limpa untuk dilakukan pengukuran variabel. Data akan dibandingkan hasilnya pada setiap periode waktu untuk menentukan perjalanan penyakit LES pada tiap periodenya.

Data dianalisis dengan cara membandingkan setiap periode waktu dan antar perlakuan. Uji komparasi dilakukan dengan menggunakan analisis data yaitu menggunakan Uji One Way Anova yang bertujuan untuk membandingkan persentase sell Th2 pada mencit yang diinduksi pristane dalam bulan ke 2,4,6 dan 8.sebelum dilakukan uji One Way Anova dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Data disajikan dalam bentuk rerata \pm standart defiasi (SD) dalam diagram batang untuk pemeriksaan klinis. Analisa data menggunakan program *SPSS 16 for Windows*. Nilai $P < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

4.9 Jadwal Kegiatan

Tabel 4.2 Jadwal Kegiatan Penelitian

No.	Bulan-2 (April 2014)	Bulan -1 (Mei 2014)	Bulan 0 (Juni 2014)	Bulan1 (Juli 2014)	Bulan 2 (Agustus 2014)	Bulan 3 (Septem- ber 2014)
1	Pengurus- an etik	Pemesanan mencit	Start penelitian (9 Juni)		Pembedah-an 1 (20 Agustus 2014) Dan Analisa Data Pembedah-an	
2		Peminjam-an Lab	Injeksi Pristane (16 Juni)		Pengukuran variabel	
No.	Bulan 4 (Oktober 2014)	Bulan 5 (November 2014)	Bulan 6 (Desember 2014)	Bulan 7 (Januari 2015)	Bulan 8 (Februari 2015)	Bulan 9 (Maret 2015)
1	Pembedah- an 2 (30 Oktober 2014) dan Analisa Data Pembedah- an 2		Pembedah-an 3 (29 Desember 2014) dan Analisa Data Pembedah-an 3		Pembedah-an 4 dan Analisa Data Pembedah-an 4	
2	Pengukur- an variabel		Pengukuran variabel		Pengukuran variabel	Analisa Data keseluru- han

4.10 Alur Penelitian

