

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* secara in vivo menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, maka jumlah hewan uji untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Christina, 2010). $(np-1) - (p-1) \geq 16$; $(5n-1) - (5-1) \geq 16$; $n \geq 4,2 \sim 5$ $n = 5$; $p = 5$. Randomisasi dengan simple random sampling.

4.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 20 Maret 2016 jam 10:54 WIB sampai tanggal 20 Maret 2016 jam 12.45 WIB di Laboratorium Instalasi Laboratorium Sentral RSSA, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian protein pencegah osteoporosis dengan menggunakan berbagai bahan yaitu *sclerostin* dan ajuvan (alum). Variabel tergantung adalah jumlah makrofag limpa.

4.5. Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus galur wistar betina berumur 2-3 bulan dengan berat 150 – 200 gram.
2. Ovariectomi: tindakan pembedahan berupa pengangkatan kedua ovarium hewan coba dengan tujuan mendapatkan model hewan coba dengan kondisi hipoestrogen.
3. Sclerostin: protein yang diproduksi di tulang oleh osteosit sebagai regulator negatif dari pembentukan tulang. Sclerostin digunakan sebagai bahan antigen untuk menginduksi antibodi anti-sclerostin. Protein sclerostin didapatkan dari sinobiological inc Beijing.
4. Makrofag : sel-sel yang memiliki fungsi primer yaitu mengidentifikasi, mencerna, dan menghancurkan mikroba.
5. Alum atau Aluminium hidroksida ($Al(OH)_3$): merupakan ajuvan atau bahan yang ditambahkan ke protein antigen untuk meningkatkan respons imun. Alum didapatkan dari sino biological inc Beijing.

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba

Alat : kandang berupa baskom dengan ukuran 20x30 cm dengan penutup kandang berupa jaring – jaring kawat sebanyak 27 buah, botol minum tikus 27 buah, timbangan analitik, handscoen, dan pembersih kandang. Bahan : sekam dan air minum untuk tikus.

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Perlakuan Ovariektomi

Alat: meja operasi kecil, baki plastik, handscoen, spuit 1 cc, alat cukur, duk steril, benang catgut, pisau tajam, jarum jahit, kasa steril, plester, cotton bud, kapas, kandang pemulihan. Bahan: ketamin, betadine solution dan alkohol 70%, basitrasin serbuk (Nebacetin), gentamisin inj, novalgin inj.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Preparasi Pemberian Protein

Alumunium hidroksida, mikropipet, eppendorf, dan vortex, Bahan: KLH, buffer konjugasi, peptide atau haptan, cairan protein karier, EDC, deionized water.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Injeksi Protein

Alat: spuit 5 cc. Bahan: protein *sclerostin*, ajuvan (Alum)

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Hewan Coba

Alat: gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, kertas label, kapas, botol steril 27 buah. Bahan: handscoen, alkohol 70%, kloroform 20 ml.

4.6.6 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Jaringan Limpa

Alat: penggaris, pinset, mikrotom, gelas objek, cetakan parafin. Bahan: BNF 10%, alkohol 90%, parafin, xylol.

4.6.7 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan *Hematoksilin dan Eosin*

Alat: mikroskop, *cover glass*, kertas label, wadah, gelas objek, *timer*. Bahan: larutan hematoksilin, larutan eosin, akuades, xylol, alkohol bertingkat (100%, 95%, 90%, 80%, 70%), *entellan* atau balsam Kanada.

4.6.8 Alat dan Bahan untuk Pengukuran Jumlah Makrofag Limpa

Alat: peralatan bedah minor, mikrotom, gelas objek, *coverslip*, mikroskop *Olympus Photo Slide BX51* dengan kamera *DP71 12 megapixel*. Bahan: limpa.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan Hewan Coba

Tikus wistar sebanyak 25 ekor dirawat dalam kandang masing – masing satu tikus satu kandang. Makan dan minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti satu minggu dua kali dan tikus ditimbang setiap minggunya.

4.7.2 Perlakuan Ovariektomi

Tikus difiksasi dalam posisi supine, kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin i.m dengan dosis 40mg/kgBB. Bulu abdomen dicukur, lalu dilakukan sterilisasi menggunakan alkohol 70% dan betadine solution lalu ditutup duk steril dan Dilakukan insisi transabdominal di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Oviduct bagian distal dan ovarium diligasi kemudian oviduct dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut, kemudian diolesi betadine dan Nebacetin, ditutup kasa steril. Kemudian diberikan

Gentamycin i.m dengan dosis 60 – 80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari (Christina, 2010).

4.7.3 Preparasi Protein *Sclerostin*

Larutkan 2 mg *Sclerostin* dalam 500 µl dari buffer konjugasi . Kemudian larutkan 10 mg EDC dalam 1 ml deionized water dan segera tambahkan 50 µl cairan ini ke dalam cairan peptide (Lateef, 2007). Konjugasi dan *coupling* protein karier dimulai dengan menambahkan 2 mg KLH yang terlyopilisasi ke dalam 200 µl buffer konjugasi. Lalu larutkan 2 mg sclerostin dalam 500 µl dari buffer konjugasi tersebut. Kemudian tambahkan 500 µl cairan peptide ke dalam 200 µl cairan protein karier. Setelah itu larutkan 10 mg EDC dalam 1 ml deionized water dan segera tambahkan 50 µl cairan ini ke dalam cairan peptide-karier (Lateef, 2007).

4.7.4 Injeksi Protein *Sclerostin*

Protein diinjeksikan bersama dengan ajuvan secara intraperitoneal sesuai dengan kadar pada masing-masing kelompok. Protein primer diinjeksikan pada hari ke-0, sedangkan *booster* diinjeksikan setiap 2 minggu sekali selama 2 bulan.

4.7.5 Pembedahan Hewan Coba

Sebelum dibedah, selama 12 jam tikus dipuasakan agar data yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh konsumsi terakhir. Tikus yang akan dibedah harus dalam keadaan hidup. Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah tikus tidak sadar,

tikus difiksasi dalam keadaan terlentang dengan jarum di atas papan yang dialasi alumunium foil. Lalu, perut dibersihkan alkohol 70%, lalu dibedah.

Limpa tikus diambil secara steril dengan gunting bedah dan pinset, kemudian limpa segera dimasukkan ke dalam botol steril yang berisi 3 ml PBS steril atau RPMI standar steril (Belinda *et. al*, 2010; Nugroho 2007).

4.7.6 Penghitungan Jumlah Makrofag

4.7.6.1 Pembuatan Preparat Jaringan Limpa

Jaringan limpa diambil sepanjang 1,5 cm. Kemudian difiksasi dengan cara direndam larutan *Buffer Neutral Formalin (BNF)* 10% selama 24 jam, setelah itu dilakukan *processing* jaringan dan diblok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut dengan ketebalan 5 μ m dan didehidrasi pada jaringan limpa yang berada pada gelas obyek. Kemudian, dilakukan pewarnaan *Hematoksilin dan Eosin* (Izzaty *et. al*, 2014).

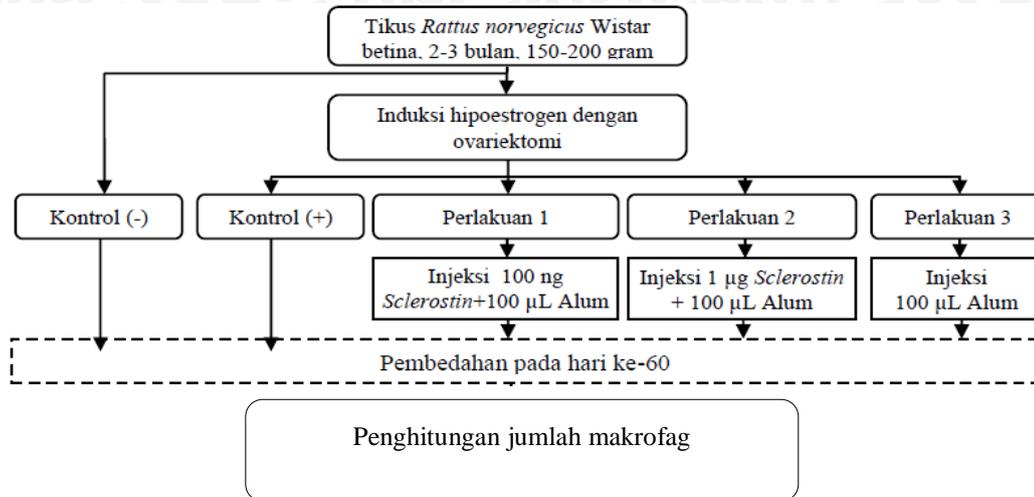
4.7.6.2 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Sampel yang telah dipotong diletakkan di atas gelas objek. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Harris Hematoksilin, cuci dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Eosin, cuci dengan alkohol bertingkat, bilas dengan aquades, keringkan. Kemudian bilas dengan air mengalir, keringkan. Tetesi dengan emelian dan tutup dengan coverslip (Arieska, 2010).

4.7.6.3 Penghitungan Jumlah Makrofag Limpa

Dengan mikroskop cahaya dilihat jumlah seluruh sel makrofag dengan perbesaran 400 kali. Tiap 20 lapang pandang tersebut hasil uji statistiknya

4.8. Skema Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Kerja Penelitian

Keterangan: Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diovariectomi dan tanpa diberikan protein sclerostin); Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diovariectomi dan tanpa diberikan injeksi protein sclerostin); Kelompok 3: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 100 ng; Kelompok 4: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 µg; Kelompok 5: tikus yang diovariectomi dengan diberikan ajuvan (Alumunium hidroksida)

4.9. Pengamatan

Pengamatan efek induksi protein *sclerostin* apakah dapat meningkatkan atau menurunkan jumlah makrofag pada limpa tikus Wistar model osteoporosis.

4.10 Pengumpulan Data

Data jumlah makrofag limpa tikus dihitung rerata 20 lapang pandang, pembesaran 1000x dengan mikroskop cahaya.

4.11. Analisis Data

Hasil penghitungan jumlah makrofag limpa tikus dianalisa secara statistik menggunakan program *IBM SPSS Statistics 20* signifikansi 0,05 ($p = 0,05$), taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 90,05$). Uji yang dilakukan adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test*, dan uji korelasi Pearson (Dahlan, 2004).

