

## 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*. Rancangan penelitian yang dipakai adalah rancangan acak kelompok (RAK).

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Target

Populasi penelitian adalah tikus Wistar jantan dengan jenis *Rattus norvegicus*. Tikus dalam penelitian ini berusia 18-20 minggu.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

###### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih galur wistar berjenis kelamin jantan
2. Usia 18-20 minggu, yang kemudian diaklimatisasi/diadaptasi selama satu minggu
3. Kondisi tikus aktif, sehat, tidak ada kelainan anatomi kaki dan luka pada tikus

###### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang mati dalam pemeliharaan penelitian
2. Tikus yang tidak mau makan, tidak mau minum
3. Tikus yang tampak sakit dan tidak aktif
4. Tikus yang keluar dan hidup di luar kandang pemeliharaan

5. Terdapat luka atau tanda radang pada tubuh tikus.

#### 4.2.3 Besar Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan teknik *random sampling*. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Anshori, M., 2008):

$$(t-1)(r-1) \geq 15;$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini  $t = 5$  sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(5-1)(r-1) \geq 15;$$

$$r-1 \geq 15:4;$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Dari hasil perhitungan tersebut, dibutuhkan sampel sebanyak 5 ekor tikus pada setiap kelompok perlakuan. Sehingga keseluruhan jumlah tikus yang diperlukan untuk penelitian ini adalah sebanyak 25 ekor.

Penentuan dosis injeksi intra articular MSU dilakukan dengan penelitian pendahuluan menggunakan tikus Wistar jantan dewasa dengan usia 15-17 minggu yang telah diadaptasikan selama 9 hari (22 hari sebelum dilakukan perlakuan pada 25 sampel tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi). Enam tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan / atau tidak memenuhi kriteria eksklusi penelitian menjadi hewan coba pada penelitian pendahuluan.

#### 4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan menggunakan teknik *random sampling* pada tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi penelitian.

Masing masing tikus diberi nomor identitas. Lalu nomor-nomor tersebut ditulis ulang di kertas kertas. Kemudian kertas dikocok dan lima kertas yang dijatuhkan dicocokkan dengan nomor tikus untuk menentukan pembagian perlakuan pada sampel per kelompok. Pengacakan ini juga dilakukan dalam pemilihan enam sampel hewan coba pada penelitian pendahuluan.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah:

1. Kolkisin dengan dosis 0.23 mg/kgBB tikus secara oral
2. ApoB dengan dosis 1.25 µg dalam konsentrasi 25µg/ml
3. ApoB dengan dosis 2.5 µg dalam konsentrasi 25µg/ml.
4. ApoB dengan dosis 3.75 µg dalam konsentrasi 25µg/ml.

#### **4.3.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel radang PMN (neutrofil) pada gambaran histopatologi anatomi sendi genu dengan pengecatan hematoksilin eosin.

#### **4.3.3 Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah Kristal MSU 0.25 mg yang diberikan secara injeksi intra articular pada seluruh kelompok sampel penelitian.

#### 4.4 Definisi Operasional

1. Hewan coba adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan umur 18-20 minggu serta dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negative (-), kelompok pembanding dengan terapi kolkisin (K), kelompok P1, P2, dan P3.
2. Apo B-100 (ApoB) adalah salah satu komponen pembentuk struktur lipoprotein dan sebagai ligan yang berikatan dengan reseptor lipoprotein di jaringan dan diperkirakan memiliki peranan penting dalam resolusi inflamasi akut arthritis gout. ApoB dalam penelitian ini berasal dari spesies *Rattus norvegicus* galur wistar, diperoleh dari Sigma Aldrich
3. Kristal MSU adalah zat yang terbukti menginduksi Artrtisi gout. Kristal MSU dalam penelitian ini didapat dari Sigma Aldrich
4. Sendi yang diinduksi inflamasi akut arthritis gout adalah sendi genu dekstra dari hewan coba.

#### 4.5 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Faal, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

#### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

##### 1. Perawatan Tikus

Bahan dan alat yang digunakan adalah kandang untuk pemeliharaan hewan coba, tutup kandang dari jarring-jaring kawat, sekam, tempat pakan, pakan, botol minum, dan alat semprot.

##### 2. Pengenceran kristal MSU

Kristal MSU, *sentrifuge* larutan PBS, dan insulin *syringe*.

##### 3. Pemberian Ekstraksi Apo B-100

Apolipoprotein B-100 37.5 µg

##### 4. Pembedahan Tikus

Ketamin 50 mg/ml, Klorofom, Formaldehid 10%, Spuit 1 cc untuk injeksi Ketamin, kristal MSU, Apo B-100, Kapas, Minor Set, Toples, Tabung organ, Tempat sampah.

##### 5. Pengukuran jumlah sel radang PMN dari gambaran *slide* histopatologi anatomi sendi genu

Hematoksilin Eosin, paraffin blok, dan tabung organ untuk menyimpan sendi genu tikus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 1. Perawatan Tikus

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, penutup kandang dengan jarring-jaring kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, pakan, dan seleksi tikus (usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan). Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium faal selama minimal tujuh hari dan dibagi menjadi 5 (lima) kelompok.

## 2. Penetapan Dosis Injeksi Intra Artikuler Monosodium Urat

Penetapan dosis injeksi intra artikuler monosodium urat dilakukan melalui penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis yang efektif untuk menimbulkan respon radang oleh kristal MSU. Penelitian sebelumnya menggunakan dosis 1,25 mg untuk tiap sisi sendi tikus untuk mendapatkan tanda-tanda radang pada genu tikus (Zheng *et al.*,2015). Dosis yang dipakai pada penelitian pendahuluan ada 5 macam dosis kristal MSU: 50µg, 100µg, 250µg, 1mg dan 1,25mg dan satu tikus untuk kontrol yang hanya diinjeksi PBS 100µl. Enam ekor tikus yang telah dipilih dengan *random sampling* kemudian diinjeksi intra artikuler dan 6 jam kemudian dibedah untuk dilihat jaringan sendinya di Laboratorium Histopatologi Anatomi FKUB.

## 3. Induksi MSU pada sendi lutut tikus

Induksi artritis gout akut dilakukan dengan kristal MSU yang telah dilarutkan dalam PBS (Phospat Buffered Saline) dengan konsentrasi 1µg/µl lalu diinjeksikan intra artikular pada sendi lutut kanan (genu dekstra) dengan dosis 0,25 mg. Injeksi dilakukan pada seluruh kelompok sampel penelitian, yaitu kelompok perlakuan I (P1), kelompok perlakuan II (P2), kelompok perlakuan III (P3), kelompok kolkisin (K), dan kelompok kontrol positif (+). Dosis ini diperoleh dari penelitian pendahuluan dimana 5 macam dosis kristal MSU: 50µg, 100µg, 250µg, 1mg dan 1,25mg dan satu tikus untuk kontrol yang hanya diinjeksi PBS 100µl. Dalam penelitian tersebut pada dosis 250µg, kristal MSU dikatakan signifikan menimbulkan peradangan (Zheng *et al.*, 2015).

### 3. Pengenceran dan Pemberian ApoB

ApoB didapat dari sigma Aldrich. ApoB diinjeksikan ke dalam cairan sinovial sendi lutut kanan (genu dekstra) tikus, yang sebelumnya di larutkan dahulu dalam larutan PBS hingga mencapai tingkat keasaman sekitar pH 7.2-7.4, menggunakan insulin *syringe*. Injeksi ApoB dilakukan dalam keadaan anestesi menggunakan ketamin. Dosis yang digunakan untuk injeksi ApoB yaitu untuk kelompok Perlakuan I (P1) sebesar 1.25  $\mu\text{g}$  dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , kelompok perlakuan II (P2) ditingkatkan 2 kali lipat menjadi 2.5  $\mu\text{g}$  dalam konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , kelompok perlakuan III (P3) ditingkatkan 3 kali lipat menjadi 3.75  $\mu\text{g}$  dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dosis ini diperoleh dari kalibrasi dosis penelitian sebelumnya yang mengatakan daya hambat infiltrasi neutrofil untuk memfagosit kristal MSU secara *in vitro* berada pada konsentrasi 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Terkeltaub et al, 1986).

### 4. Pemberian Kolkisin sebagai terapi pembanding

Kolkisin diberikan pada kelompok Kolkisin (K) dengan menggunakan sonde dengan dosis 0,23mg/kgBB (Pareek et al., 2011) sebagai pembanding hasil terapi terhadap kelompok yang diberi ApoB.

### 5. Perlakuan pada kelompok kontrol positif

Kontrol positif merupakan kelompok yang diinduksi inflamasi akut gout arthritis namun tidak diberi perlakuan terapi apapun.

### 6. Pembedahan Tikus

Pembedahan dilakukan dengan inhalasi menggunakan klorofom dalam suatu wadah tertutup. Darah diambil terlebih dahulu dengan

sprit 1 ml melalui jantung untuk penelitian lain. Setelah itu, ambil organ sendi genu dekstranya dan difiksasi ke dalam formalin 10%.

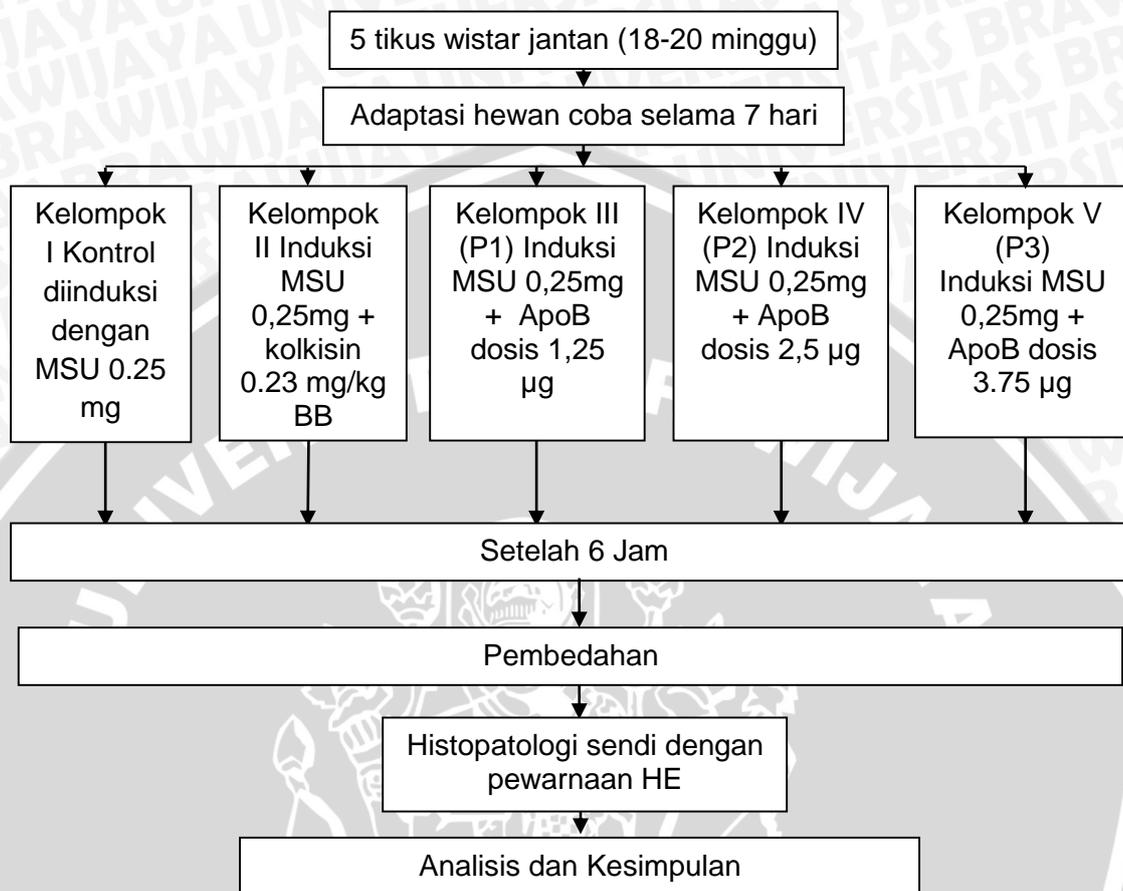
#### 7. Pengukuran jumlah sel radang PMN dari gambaran slide histopatologi anatomi sendi genu

Organ sendi genu dekstra tikus difiksasi dalam formalin 10% terlebih dahulu kemudian dibuat menjadi *slide* histopatologi anatomi dengan pewarnaan hematoksin eosin di lab Patologi Anatomi FKUB. Kemudian jumlah sel radang dihitung dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dan perhitungan dilakukan pada delapan lapang pandang di tiap sampel *slide* histopatologi anatomi. Perhitungan dari delapan lapang pandang tersebut dijumlahkan untuk mengetahui jumlah sel radang tiap tikusnya. Lalu dilakukan perhitungan rata-rata untuk tiap kelompok tikus. Perhitungan dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan hasil konsulen dari Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang.

#### 4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan. Data yang diperoleh akan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak. Kemudian uji varian dilakukan untuk menentukan varian data sama (homogen) atau tidak. Lalu dilakukan uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc test* (uji *Least Significant Difference*) yang kemudian dilanjutkan dengan uji korelasi pearson dan uji regresi linier. Seluruh uji statistik memiliki tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.9 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.1. Bagan Alur Penelitian

#### 4.10 Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Bulan			
		1	2	3	4
Tahap Persiapan					
1	Ethical Clearance				
2	Izin Laboratorium				
3	Persiapan alat dan bahan				
4	Adaptasi tikus				
Tahap Pelaksanaan					
1	Injeksi Kristal MSU				
2	Injeksi Apo B-100				
3	Pembedahan dan pengambilan sampel organ serta analisis				

Tabel 4.1. Jadwal Penelitian