

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus hingga November 2015. Pengujian kualitatif dengan *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) untuk mengidentifikasi keberadaan glukosamin dalam cangkang siput air di Laboratorium Kimia Analisis dan Instrumentasi Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Ekstraksi cangkang siput air dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pemotretan preparat kartilago artikular, pengukuran ketebalan kartilago artikular serta penghitungan jumlah kondrosit dilakukan di Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

### 4.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya adalah kandang, botol minum tikus, disposable syringe 1 cc, gloves, masker, label, timbangan, kandang individu, gunting, pot organ, microtome, waterbath, spuit, vortex, oven, shaker, penggiling, saringan, cover gelas, objek gelas dan mikroskop.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan 150-200 gram strain wistar, pakan dan

minum hewan coba, enzim papain, sodium asetat 0.05 M pH 4.5, cangkang siput air, HCL 0.5 M, NaOH I N, NaOH 2 N, HCl, arang aktif, larutan formalin 10%, asam sitrat 10%, alkohol 70% dan 30%, ketamine, xylazin, kapas, water steril, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, NaCl fisiologis, akuades, parafin, pewarna hemaktosilin dan eosin, xylol, etanol bertingkat (70%, 80%, 90% dan absolut).

### 4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi ekstrak cangkang siput air
  - 1.1 Pengambilan cangkang siput air dari kota Bandung, Jawa Barat.
  - 1.2 Ekstraksi cangkang siput air
2. Persiapan hewan model osteoarthritis
  - 2.1 Pemilihan tikus putih jantan sebagai hewan coba
  - 2.2 Pembuatan hewan coba osteoarthritis yang diinduksi dengan enzim papain secara intraartikular
3. Terapi osteoarthritis dengan ekstrak cangkang siput air
4. Analisis histopatologi kartilago artikular
  - 4.1 Pengambilan jaringan sendi
  - 4.2 Analisis histopatologis terhadap tebal lapisan kartilago artikular dan jumlah kondrosit
5. Analisis data

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen murni dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan beberapa kondisi perlakuan.

Perlakuan dikelompokkan menjadi 4 kelompok dengan masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan. Perlakuan yang digunakan adalah kontrol negatif (P1), kontrol positif (P2), hewan coba yang diberi ekstrak cangkang siput air sebanyak 1 g/kg BB per hari (P3) dan tikus yang diberi ekstrak cangkang siput air sebanyak 3 g/kg BB (P4) per hari (Naito *et al.*, 2010) dicampur pakan tikus 25 gr yang dibentuk bulatan.

Perlakuan yang digunakan terdiri dari:

- P1 : Kelompok kontrol negatif. Tanpa diinduksi enzim papain dan tanpa diberi ekstrak cangkang siput air
- P2 : Kelompok kontrol positif. Induksi enzim papain 10 mg dalam larutan sodium asetat 0,05 M dengan volume 0,5 ml secara intraartikular pada hari ke-8, 11 dan 14 setelah aklimatisasi selama 7 hari
- P3 : Kelompok perlakuan 1. Induksi enzim papain 10 mg dalam larutan sodium asetat 0,05 M dengan volume 0,5 ml secara intraartikular pada hari ke-8, 11 dan 14 setelah aklimatisasi selama 7 hari. Terapi ekstrak cangkang siput air diberikan pada hari ke-15 sampai hari ke-45 (30 hari) dengan dosis 1 g/kg BB per hari dengan dicampur pakan tikus 25 gr yang dibentuk bulatan
- P4 : Kelompok perlakuan 2. Induksi enzim papain 10 mg dalam larutan

sodium asetat 0,05 M dengan volume 0,5 ml secara intraartikular pada hari ke-8, 11 dan 14 setelah aklimatisasi selama 7 hari. Terapi ekstrak cangkang siput air diberikan hari ke-15 sampai hari ke-45 (30 hari) dengan dosis 3 g/kg BB per hari dicampur pakan tikus 25 gr yang dibentuk bulatan

#### 4.5 Prosedur Kerja

##### 4.5.1. Preparasi dan ekstraksi cangkang siput air (*Pila ampullacea*)

Cangkang siput air diperoleh dari kota Bandung, Jawa Barat. Glukosamin yang didapatkan dari ekstrak cangkang siput air yaitu berupa glukosamin *hole* yang diuji secara kualitatif dengan metode *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) untuk mengidentifikasi keberadaan glukosamin dalam cangkang siput air. Kemudian dilakukan ekstraksi cangkang siput air (*Pila ampullacea*) yang bertujuan untuk mengambil glukosamin yang terkandung di dalamnya. Metode ekstraksi dilakukan dengan metode yang digunakan Sibi, *et al* (2013). Tahapan ekstraksi yang dilakukan meliputi proses demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi.

Pada proses demineralisasi, cangkang siput air dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang ada pada cangkang. Kemudian cangkang dikeringkan dibawah sinar matahari selama 24 jam. Setelah dikeringkan, cangkang diberi 0,5 M HCl (1:14 w/v) selama 8 jam di suhu ruang lalu dicuci dengan air untuk menghilangkan kalsium klorida (Sibi *et al.*, 2013).

Tahapan selanjutnya yaitu deproteinase dengan cara cangkang yang telah dilakukan demineralisasi diberi 1N NaOH (1:12 w/v) pada suhu 90°C selama 2 jam dan residu dinetralisasi dengan air mengalir. Selanjutnya cangkang yang dideproteinase dikeringkan dibawah sinar matahari untuk mendapatkan kitin yang selanjutnya digunakan untuk memproduksi kitosan melalui proses deasitilasi (Sibi *et al.*, 2013).

Pada tahapan ketiga, dilakukan proses deasitilasi dengan cara kitin diberi larutan 2 N NaOH (1:14 w/v) untuk menghilangkan gugus asetil pada suhu ruangan selama 8 jam pada pengocok (*shaker*). Kemudian kitosan dicuci dengan air mengalir dan diikuti dengan *distillated water* dan dikeringkan di bawah sinar matahari (Sibi *et al.*, 2013).

Untuk mendapatkan glukosamin, kitosan digiling dan dihidrolisis dengan HCl pada suhu 90°C selama 75 menit. Hasilnya berupa material coklat kehitaman yang kemudian dilarutkan pada air yang telah disaring (*distilled water*) dan warnanya dihilangkan (*decolourisation*) dengan menggunakan arang aktif. Setelah itu, larutan disaring dan hasilnya dievaporasi pada suhu 45°C untuk mendapatkan glukosamin. Kristal-kristal tersebut kemudian dicuci dengan ethanol dan dikeringkan pada oven dengan suhu 50°C (Sibi *et al.*, 2013). Hasil akhir ekstrak cangkang siput air berupa serbuk berwarna putih.

#### 4.5.2 Persiapan hewan model osteoarthritis

##### 1. Pemilihan tikus putih sebagai hewan coba

Hewan model yang digunakan pada penelitian yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan dengan berat badan tikus 150-200 gram dengan umur 10 – 12 minggu.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus: (Kusriningrum, 2010)

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$N \geq 19/4$$

$$N \geq 4.7$$

Keterangan :

T = Jumlah kelompok perlakuan

N = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok sehingga diperlukan 20 ekor hewan coba. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Terapi ekstrak cangkang siput air dan induksi enzim papain

Variabel terikat : Tebal lapisan kartilago artikular dan jumlah kondrosit

Variabel kontrol : Jenis kelamin, strain, umur, berat badan, lingkungan kandang dari hewan coba, serta pakan dan minum yang diberikan.

Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Selanjutnya tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 ekor. Tikus dikandangkan berkelompok dalam kandang yang terbuat dari bak plastik yang dilengkapi dengan tempat minum dan penutup kawat saat proses aklimatisasi. Pada saat dilakukan terapi ekstrak cangkang siput air tikus kelompok P3 dan P4 dipindahkan ke dalam kandang individu.

## **2. Preparasi dan induksi enzim papain pada hewan model osteoarthritis**

Cara pembuatan hewan model OA yaitu dengan dilakukan anestesi terlebih dahulu pada tikus putih (P2, P3 dan P4) dengan menggunakan ketamine dan xylazin. Menurut Hall, *et all* (2001), dosis ketamin dan xylazin yang digunakan pada tikus yaitu ketamin 40-87 mg/kg BB (konsentrasi 100 mg/ml) dan xylazin 5-13 mg/kg BB (konsentrasi 20 mg/ml) secara

intramuskular (Lampiran 12). Setelah itu diberi antiseptik alkohol 70 %.

Pembuatan larutan enzim papain yaitu dengan memasukkan 2 mg sodium asetat ke dalam tabung reaksi dan menambahkan akuades sebanyak 0,5 ml. Selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Setelah homogen, ditambahkan enzim papain sebanyak 10 mg dan dihomogenkan kembali dengan menggunakan vortex (Lampiran 9).

Rambut pada area injeksi enzim papain dicukur, yaitu kaki kanan belakang hewan coba diantara os femur dengan os tibia-fibula (sendi femorotibial) dan diberi antiseptik alkohol 70%. Setelah itu, diinjeksikan enzim papain dengan dosis 10 mg dalam larutan sodium asetat 0,05 M pH 4,5 dengan volume 0,5 ml secara intraartikular menggunakan *syringe* 1 ml dan jarum 29 G pada hari ke-8, 11 dan 14 setelah 7 hari proses aklimatisasi (Khan *et al.*, 2013).

Efek dari enzim papain dapat dilihat dengan melakukan pengukuran diameter pada lokasi penginjeksian enzim papain setiap hari selama 7 hari. Efek dari pemberian ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*) dapat dilakukan melalui pengukuran diameter pada lokasi penginjeksian di area sendi lutut kaki kanan hewan coba setiap 2 hari sekali selama 30 hari.



Gejala osteoarthritis akibat pemberian enzim papain pada hewan coba dapat dilakukan pengamatan diantaranya yaitu perubahan gaya berjalan, hambatan gerak sendi lutut, serta tanda-tanda peradangan meliputi kemerahan (rubor), nyeri (dolor), pembengkakan disekitar lokasi injeksi papain (Sutjiati, 2000).

#### **4.5.3 Terapi ekstrak cangkang siput air (*Pila ampullacea*) pada hewan model osteoarthritis**

Hewan coba pada kelompok P3 dan P4 diberikan terapi berupa pemberian ekstrak cangkang siput air setelah injeksi enzim papain dengan dosis 1 g/kg BB pada kelompok P3 dan 3 g/kg BB pada kelompok P4 dengan frekuensi pemberian sehari sekali pada pagi hari (Naito *et al.*, 2010) selama 30 hari secara per oral (Khan *et al.*, 2014) dengan dicampur pakan tikus 25 gr yang dibentuk bulatan, dan selanjutnya dilihat efeknya terhadap progresifitas dari OA.

#### **4.5.4 Analisis histopatologi tebal lapisan kartilago artikular dan jumlah kondrosit**

##### **1. Eutanasi dan pengambilan jaringan sendi**

Eutanasi yang dilakukan yaitu dengan cara dislokasi leher. Keberhasilan dislokasi leher pada hewan coba ditandai dengan terputusnya spinal cord, tidak adanya respirasi dan denyut jantung (Institutional animal care and use committee, 2013). Pembedahan dilakukan dengan posisi tikus rebah dorsal.

Pengambilan jaringan sendi kaki hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan setelah pemberian ekstrak cangkang siput air selama 30 hari dilakukan dengan cara memotong bagian kaki tikus pada tempat injeksi enzim papain yaitu kaki belakang kanan pada pertengahan os femur dan pada pertengahan os tibia-fibula. Kulit yang menempel di muskulus dibuang dan organ yang diambil kemudian dicuci dengan PBS dengan pH 7,4 dan difiksasi dengan cara direndam ke dalam pot organ yang berisi campuran PBS pH 7,4 dan formalin 100% dengan perbandingan 9:1. Pengambilan jaringan sendi digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoksin dan eosin (HE).

## 2. Pembuatan preparat histopatologi

Pengamatan histopatologi tulang rawan sendi dilakukan dengan cara membuat preparat histopatologi dengan metode HE. Metode pembuatan preparat histologi menurut Mescher (2009) yaitu dengan cara fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, dan pewarnaan. Setelah organ di fiksasi pada larutan formalin 10 %, selanjutnya dilakukan dekalsifikasi pada tulang rawan artikular dengan asam sitrat 10% selama 3x24 jam. Dekalsifikasi hanya dapat dilakukan apabila organ telah difiksasi sebelumnya. Setelah dilakukan dekalsifikasi, jaringan sendi didehidrasi dengan

menggunakan etanol bertingkat dimulai pada konsentrasi 70% selama 24 jam, 80% selama 2 jam, 90%, 95%, dan etanol absolut selama 20 menit. *Clearing* dilakukan dengan merendam jaringan tulang rawan articular dalam larutan xylol selama 20 menit dan 30 menit, selanjutnya proses infiltrasi dan *embedding* menggunakan paraffin cair pada inkubator bersuhu 58° - 60°C. Setelah proses *embedding*, preparat diletakkan pada sebuah alat yang disebut dengan *microtome* dan dipotong sekitar 4-6µm. Sediaan selanjutnya disimpan dalam *water bath* bersuhu 38° - 40°C selama 24 jam dan selanjutnya diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin (Mescher, 2009).

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan xylol I dan xylol II masing-masing selama 3 menit, etanol absolut I dan etanol absolut II masing-masing selama 3 menit, etanol 90% dan etanol 80% masing-masing selama 3 menit, dibilas dengan air keran selama 1 menit, dicelupkan dalam larutan hematoksilin selama 6-7 menit, dibilas dengan air keran kembali selama 1 menit, dicelupkan dalam larutan eosin selama 1-5 menit, lalu dibilas dengan air keran selama 1 menit, dicelupkan dalam larutan etanol 80%, etanol 90% dan etanol absolut masing-masing sebanyak 10x celupan, kemudian dicelupkan dalam etanol absolut selama 1 menit, lalu xylol I, xylol II dan xylol III

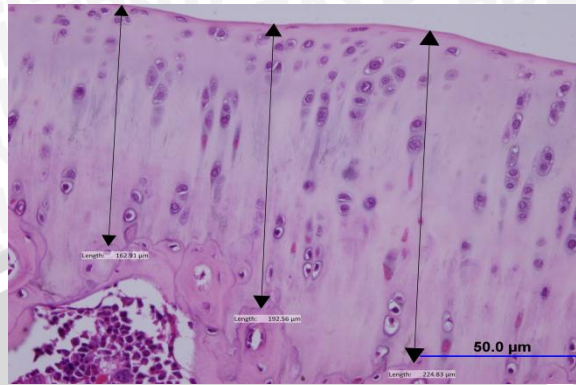
masing-masing selama 3 menit. Preparat setelah itu diangkat dari larutan terakhir dalam keadaan basah, kemudian diberi satu tetes cairan perekat, selanjutnya ditutup dengan *cover glass*.

#### **4.5.5 Pengambilan data tebal kartilago artikular dan jumlah kondrosit**

Pengukuran tebal kartilago artikular dan penghitungan jumlah kondrosit kartilago artikular dilakukan pada sendi lutut kanan belakang bagian proximal os tibia-fibula. Hasil pengamatan preparat histopatologi kartilago artikular dengan metode pewarnaan hematoksilin dan eosin menggunakan mikroskop cahaya Olympus® pembesaran lemah (100x) dan pembesaran kuat (400x) (Muntiha, 2001) untuk melihat adanya perubahan ketebalan lapisan kartilago artikular dan jumlah kondrosit. Sedangkan cara pengukuran dari masing-masing parameter adalah sebagai berikut :

##### **4.5.5.1 Ketebalan kartilago artikular**

Ketebalan kartilago artikular diukur menggunakan aplikasi *opticlub viewer* dan *image raster 3* yang diukur dari jarak permukaan tulang sendi sampai tulang sub-kondral. Ketebalan kartilago artikular diukur dengan 5 lapang pandang dengan 1 lapang pandang masing-masing diukur 3x pengukuran pada area samping kiri, tengah dan samping kanan.



**Gambar 4.1** Pengukuran Tebal Lapisan Kartilago Artikular Hewan Coba Tikus. Pewarnaan HE, Pembesaran 400X (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan:

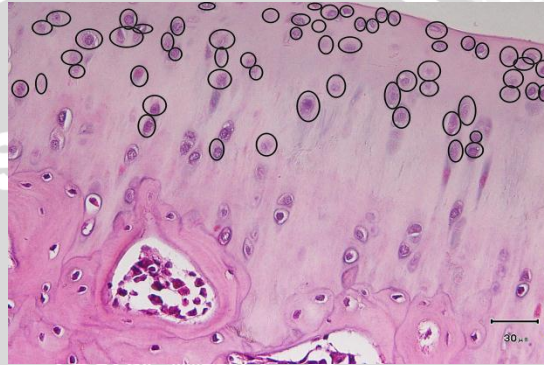
↕ = Ketebalan kartilago

#### 4.5.5.2 Jumlah kondrosit

Jumlah kondrosit dihitung menggunakan aplikasi *opticlub viewer* dan *image raster 3* yang dihitung dengan 5 lapang pandang dari zona superfisial-radial dan merupakan kondrosit yang sehat dengan ciri berbentuk bulat atau polygonal, kecuali pada bagian yang permukaan artikular sendi, kondrosit berbentuk agak rata (diskoid). Bagian intraselulernya banyak terdapat retikulum endoplasma kasar, apparatus golgi juxt nuklear dan deposisi glikogen, yang menunjukkan karakteristik dari sel aktif.

Pemberian ekstrak cangkang siput air dapat menginduksi *stem cell* pada *bone marrow* sehingga terjadi regenerasi dari prekondrosit yang selanjutnya akan bermaturasi menjadi kondrosit yang menghasilkan matriks ekstraseluler. Jumlah kondrosit digunakan sebagai indikasi dari setiap perubahan yang terjadi pada tingkat selular tulang rawan sendi. Jumlah kondrosit

banyak menunjukkan adanya regenerasi yang dimulai dari prekondrosit. Sebaliknya jumlah kondrosit rendah atau berkurang menunjukkan adanya kerusakan pada kondrosit.



**Gambar 4.2** Penghitungan Jumlah Kondrosit Kartilago Artikular Hewan Coba Tikus. Pewarnaan HE, Pembesaran 400X (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan:

○ = Kondrosit

#### 4.5.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif. Data kuantitatif tebal lapisan kartilago artikular serta jumlah kondrosit dengan analisa *one way ANOVA (Analysis of Variance)* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pada perlakuan, yang kemudian dilanjutkan dengan *Tukey's Procedure* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ) antar perlakuan menggunakan *Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 16.0 for windows*.