

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara *in vivo* untuk membuat hewan coba lupus standar dan melihat peningkatan persentase sel Th1 serta peningkatan kadar ANA sebagai tanda penyakit LES pada mencit Balb/c yang diinduksi pristane. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni laboratorik dengan menggunakan desain *post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Mencit strain Balb/c sebagai sampel dari penelitian ini dan diinduksi dengan pristane untuk menjadi mencit model lupus eritamosus sistemik (LES) lalu diukur dengan menggunakan beberapa marker.

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit subjek penelitian ini :

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

Berikut ini adalah kriteria eksklusi subjek penelitian :

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan

2. Mencit yang mati atau dalam kondisi yang menurun selama penelitian berlangsung

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah dua perlakuan, mencit Balb/c betina dibagi menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut :

Tabel 4.2 Pembagian kelompok sesuai perlakuan pada mencit Balb/c

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol	Dianalisa pada bulan ke-2 dan 4
Kelompok P1	Diberikan pristane dan dianalisa bulan ke-2
Kelompok P2	Diberikan pristane dan dianalisa bulan ke-4
Kelompok P3	Diberikan pristane dan dianalisa bulan ke-6
Kelompok P4	Diberikan pristane dan dianalisa bulan ke-8

Estimasi 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 sebagai berikut:

$$(5-1) (t-1) > 15$$

$$4(t - 1) > 15$$

$$t - 1 > 3.75$$

$$t > 4.75$$

$n \geq 4,75$ 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 yang dikali lima perlakuan maka total mencit yang dipakai menjadi 35 ekor mencit Balb/c. Penambahan jumlah sampel tersebut bertujuan untuk memenuhi data minimal.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, pembedahan hewan coba, dan pengambilan organ limpa dan Laboratorium Biomedik untuk mengukur flowsitometri. Penelitian ini dimulai bulan April 2014 sampai bulan Maret 2015.

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. Dilakukan pembagian mencit menjadi dua kelompok yaitu, kelompok kontrol (tanpa perlakuan) dan kelompok perlakuan (diinduksi pristane). Kelompok perlakuan

dibagi menjadi empat kelompok berdasarkan lama waktu induksi, yaitu: kelompok perlakuan induksi pristane bulan ke-2, 4, 6, dan 8.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah Persentase Sel Th1 pada limpa mencit Balb/c yang diinduksi pristane.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Mencit Balb/c

Mencit Balb/c merupakan sampel dari penelitian ini. Mencit Balb/c dapat memberikan gambaran klinis dan imunologis lupus seperti yang terjadi pada manusia. Mencit diperoleh dari Lembaga Pusuebma Surabaya dengan surat keterangan keaslian Balb/C sebanyak 35 ekor. Kriteria mencit yang dibeli adalah sebagai berikut :

- Mencit Balb/C betina karena memiliki faktor hormonal yang mempengaruhi terjadinya LES lebih cepat
- Berkulit putih mengkilat, sehat, dan aktif
- Usia 6-8 minggu
- Bb 25-30 gr

4.5.2 Injeksi Pristane

Pristane adalah senyawa suatu alkana isoprenoid yang ditemukan tinggi konsentrasinya dalam minyak mineral, merupakan salah satu metode pengembangan murine model dari LES. Pristane didapatkan dari pabrik

SantaCruz dengan sediaan langsung berbentuk larutan 100 ml/cc dalam botol.

Prosedur injeksi yang dilakukan adalah sbb:

- Mencit kelompok kontrol positif (28 ekor) disiapkan terlebih dahulu dan dipisahkan dari kelompok kontrol negatif
- Pristane dipersiapkan dan diambil menggunakan spuit insulin 1cc sebanyak 0,5ml
- Mencit diambil dan diposisikan terlentang untuk melakukan injeksi
- Injeksi dilakukan secara intraperitoneal pada daerah inguinal mencit yang disuntikkan secara sejajar dengan tubuh mencit.

4.5.3 persentase Th1

Staining untuk pengukuran persentase dilakukan dengan antibodi anti-PE-CD4⁺ dan anti-PerCP-IFN_γ. Antibodi tersebut didapatkan dari pabrik Biotend. Proses pengukuran persentase sel menggunakan flowsitometri dilakukan sesuai dengan prosedur dari pabrik. Pengukuran dilakukan pada 10.000 sel dan hasil didapatkan dalam bentuk persentase sel. Sel Th1 merupakan sel yang mengekspresikan CD4⁺ IFN_γ.

Pada flowsitometri pengukuran dilakukan pada regio kanan atas pada dot plot yang menunjukkan positif ganda CD4 dan IFN_γ.

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

- Induksi mencit BALB/c model LES: Pristane (*Sigma Aldrich* no.catalog p2870-100ML) 0,5ml

- Alat dan bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit : gunting bedah, pinset, jarum pentil, sterofom atau papan fiksasi, kapas, clorofoam, formalin 10%, alkohol, vacutainer, spuit 1cc.
- Alat yang digunakan untuk flowsitometri: FACS Caliber tube
- Bahan yang digunakan untuk flowsitometri: Cairan CSB (Biolegend), antibodi anti-PE-CD4⁺ (Biolegend), anti-PerCP-IFN γ (Biolegend), fix *buffer* (Biolegend), Perm *buffer* (Biolegend).

4.7 Prosedur Penelitian

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 sebagai model hewan coba lupus terinduksi pristane. (Satoh, *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

Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu mencit yang diinjeksikan pristane dan mencit yang tidak diinjeksikan *pristane* sebagai kontrol.

Sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya, *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). Prosedur injeksi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- Mencit kelompok kontrol positif (28 ekor) disiapkan terlebih dahulu dan dipisahkan dari kelompok kontrol negatif
- Pristane dipersiapkan dan diambil menggunakan spuit insulin 1cc sebanyak 0,5ml
- Mencit diambil dan diposisikan terlentang untuk melakukan injeksi
- Injeksi dilakukan secara intraperitoneal pada daerah inguinal mencit yang disuntikkan secara sejajar dengan tubuh mencit.

4.7.3 Pembedahan Mencit

Pembedahan mencit dilakukan pada bulan ke-2, 4, 6, dan 8. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimasukkan ke dalam toples yang sudah berisi kapas+*clorofoam*. Setelah mencit pingsan kemudian mencit diterlentangkan di papan bedah. Tangan dan kaki mencit ditusukkan jarum sonde agar tidak bergeser saat proses. Pembedahan dimulai dari dada secara melintang menggunakan gunting. Kemudian gunting atau ambil limpa mencit dan masukkan pada cawan petri yang sudah berisi PBS. Setelah darah dan limpa

mencit diambil, proses dilanjutkan di lab biomedik FK UB untuk dilakukan proses flowcitometri dan ELISA.

4.7.4 Persiapan Pengukuran sel Th1

Limpa diisolasi dan dimasukkan dalam *petridish* yang sudah mengandung PBS. Kemudian, homogenasi limpa menggunakan *plunger* sampai dengan terhomogenasi sempurna. Hasil homogenasi difilter menggunakan *cell stainer* lalu disentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit, dibuang *supernatannya*. Ditambahkan ionomicin 2,5 μ l dan PMA 12,5 μ l dan diinkubasi selama 4 jam di dalam inkubator dalam suhu 37⁰ C. Setelah diinkubasi, dilakukan sentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit kemudian ditambahkan 250 μ l CSB. Kemudian, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 3 menit dan ditambahkan larutan CSB 50 μ l dan antibodi anti-PE-CD4⁺. Setelah pemberian antibodi, diinkubasi selama 20 menit pada 4^oC dan diberikan Fix Perm Buffer 250 μ l, dilanjutkan dengan sentrifugasi, kemudian diberikan Perm Buffer 250 μ l. Disentrifugasi 1200 rpm selama 3 menit dan ditambahkan anti-PerCP-IFN γ , inkubasi selama 20 menit pada 4^oC lalu sentrifugasi 1200rpm selama 3 menit, ditambahkan CSB 300 μ l lalu pindahkan ke dalam tabung *flowcytometer* untuk *dirunning*.

4.7.5 Pengukuran Persentase Sel Th1 pada Limpa

Pengukuran persentase sel Th1 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-IFN- γ . Proses pengukuran persentase sel menggunakan flowsitometri dilakukan sesuai dengan prosedur dari pabrik. Pengukuran dilakukan pada 10.000 sel dan hasil didapatkan dalam bentuk persentase sel. Sel Th1 merupakan sel yang mengekspresikan CD4⁺ IFN- γ .

4.7.6 Pengukuran Kadar Anti Nuklear Antibodi

Pemeriksaan ANA pada semua mencit dilakukan dengan metode ELISA (Mybiosource, USA, katalog MBS9302408). Sampel berasal dari darah jantung mencit kemudian lakukan *pipetting* 100 μ l sampel untuk didilusi. Sampel yang sudah didilusi kemudian diletakkan pada *plate*, tambahkan 50 μ l *Biotin-conjugated*. *Coating* permukaan *plate* lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan dengan kecepatan 400 rpm. *Washing plate* sebanyak 5 kali dengan *wash buffer* kemudian tambahkan 100 μ l Streptavidin-HRP dan lapis permukaan. Inkubasi kembali setelah itu *washing plate* sebanyak 5 kali. Tambahkan 100 μ l *TMB Substrate Solution* lalu inkubasi selama 30 menit. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* dan dibaca pada panjang gelombang 450nm.

4.7.7 Visual Arthritis Skor

Mencit yang telah diinjeksi dengan pristane diukur derajat terjadinya arthritis pada sendinya. Derajat arthritis diukur berdasarkan pengamatan visual. Pengamatan visual dilakukan setiap sebelum pembedahan dengan menilai bentuk morfologi kaki depan dan belakang. Sistem skor nya adalah sebagai

berikut, 1 poin diberikan jika terdapat inflamasi masing-masing jari atau tulang, 5 poin diberikan jika terdapat inflamasi pada pergelangan kaki depan atau belakang, sehingga dihasilkan skor maksimal sebesar 15 poin tiap kaki atau 60 poin tiap mencit (Bas, *et al.*, 2012). Pengukuran dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.8 Pengolahan Data

Data dianalisis yang diperoleh dalam bentuk persentase sel Th1. Data dianalisis dengan cara membandingkan setiap periode waktu dan antar perlakuan. Uji perbandingan dilakukan dengan uji ANOVA. Data disajikan dalam bentuk rerata \pm Standar Deviasi (SD) dalam grafik garis. Analisa data menggunakan program *SPSS 16 for Windows*. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan perubahan nilai yang bermakna.