

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium dengan menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk membuat suatu standar hewan coba lupus menggunakan mencit Balb/c yang diinduksi oleh pristane dan untuk melihat pengaruhnya terhadap kadar ANA.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah mencit betina strain Balb/c yang diinduksi pristane untuk menjadi mencit lupus eritamosus sistemik (LES) yang kemudian diukur beberapa marker. Mencit betina dipilih dikarenakan prevalensi penyakit lupus banyak pada populasi wanita dibandingkan pria. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut disebabkan 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:

Tabel 4.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan

Kriteria inklusi	Kriteria eksklusi
Mencit strain Balb/c betina	Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
Mencit bewarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal	Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
Umur 6-8 minggu	
Berat badan rata-rata 25-30 gram	

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan. Pembagian masing-masing anggota kelompok berdasarkan perlakuan. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Sehat	tidak diberikan perlakuan apapun
Perlakuan 1	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-8
Perlakuan 2	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-16
Perlakuan 3	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-24
Perlakuan 4	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-32

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:

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

n : jumlah ulangan

p : jumlah perlakuan

Pada penelitian ini terdapat lima kelompok sehingga didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

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

$$n(5 - 1) \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 3,75 \text{ dibulatkan keatas menjadi } 4$$

Untuk 5 kelompok, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak empat kali. Namun untuk mencegah adanya kehilangan data akibat mati setelah perlakuan maka setiap kelompok mencit ditambahkan tiga sampel sehingga masing-masing kelompok didapatkan tujuh mencit yang dikali lima kelompok maka total mencit yang dipakai menjadi 35 ekor mencit Balb/c. Penambahan jumlah sampel tersebut bertujuan untuk memenuhi data minimal.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi untuk pemeliharaan hewan coba mencit, pembedahan hewan coba. Setelah itu pemeriksaan kadar ANA dilakukan di Laboratorium Kawi. Penelitian dilaksanakan pada 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.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar ANA yang diukur pada minggu ke-8,16,24 dan 32.

4.4.3 Variabel Perancu

Variabel perancu dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat mengakibatkan perancu atas variabel tergantung yang dihasilkan seperti kemungkinan infeksi, suhu ruangan, diet, dan kelembapan kandang.

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 (Rottman dan Wilis, 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.
- Berbulu 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 laboratorium selama kurang lebih satu minggu. Kegiatan ini bertujuan untuk mengadaptasikan hewan coba pada kondisi laboratorium sehingga tidak stress saat dilakukan perlakuan.

4.5.2 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 Santacruz,USA.

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.

4.5.3 Kadar ANA Pada Serum

Tes ANA merupakan penapisan awal yang efektif untuk mengetahui manifestasi gejala LES. Pengambilan sampel dilakukan pada serum mencit Balb/c secara berkala saat dilakukan pembedahan yaitu pada minggu ke-8,16,24, dan 32. Pengecekan kadar ANA pada mencit dilakukan menggunakan mouse ANA Platinum ELISA kit (*e-bioscience*) dan dilakukan menggunakan ELISA reader di Laboratorium Kawi. Data yang di dapatkan adalah berupa satuan ng/dl.

4.5.4 Manifestasi Klinis Pada Mencit

Mekanisme yang dapat mendasari munculnya manifestasi klinis akibat pemberian pristane adalah adanya stimulasi dari apoptosis setelah injeksi pristane. Manifestasi Klinis yang dapat dijumpai pada mencit adalah *malar rush* (ruam kulit), artritis , proteinuria , asites, vaskulitis dan alopesia (bulu rontok).

4.5.5 Penegakan Diagnosa LES

Untuk menegakkan diagnosa LES dari Kriteria Diagnosis SLE menurut American College of Rheumatology bila dijumpai 4 atau lebih kriteria manifestasi klinis, diagnosis SLE memiliki sensitifitas 85% dan spesifisitas 95%. Sedangkan bila hanya 3 manifestasi klinis dan salah satunya ANA positif, maka sangat mungkin SLE dan diagnosis bergantung pada pengamatan klinis. Bila hasil tes ANA negatif, maka kemungkinan bukan SLE. Apabila hanya tes ANA positif dan manifestasi klinis lain tidak ada, maka belum tentu SLE, dan observasi jangka panjang diperlukan.

4.6 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan untuk melakukan pembedahan mencit :

- Guntingbedah
- Pinset
- Jarumpentul
- Strefoam atau papan fiksasi
- Kipas

Bahan yang digunakan untuk pembedahan mencit :

- Clorofoamataueter
- Formalin 10%
- Alcohol
- Vacutainer
- Sput 5cc

Alat untuk Pengukuran Kadar serum menggunakan Elisa

- Elisa reader
- sentrifuse,
- vortex,
- pipet mikro,
- tip biru kuning dan putih,
- tabung falcon 15ml,
- tabung ependorf,
- vauntainerd dengan heparin,
- spuit 1 ml,
- minor set,
- cawan dan mortar

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 sebaagai model hewan coba lupus terinduksi pristane. Selain itu, mencit Balb/c juga merupakan mencit yang memiliki karakteristik imunologis yang hampir mirip dengan manusia (Satoh, *et al.*, 1996; Rottmandan 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 minggu ke-8, 16, 24, dan 32 (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 kearah 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

Pengambilan sampel untuk pengukuran variabel dilakukan pada minggu ke-2, ke-4, ke-6, dan ke-8. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimasukkan ke dalam toples yang sudah berisi kapas dan *cloroform*. Setelah mencit tidak sadar kemudian mencit diposisikan terlentang di papan bedah, tangan dan kakinya ditusuk jarum pentul agar tidak bergeser saat proses pembedahan berlangsung. Sampel darah mencit berasal dari darah jantung mencit diambil menggunakan Spuit 1cc.

4.7.4 Pengukuran Kadar ANA pada Serum

Pengukuran kadar ANA serum diukur menggunakan metode ELISA. Serum diambil pada minggu ke-8, 16, 24, dan 32 paska injeksi pristane untuk menilai tren perkembangan ANA serum setelah injeksi pristane. Tes kadar

ANA diperiksa melalui sampel darah yang diambil di jantung. Selanjutnya kemudian dilakukan *pipetting* 100 μ l sampel darah 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.

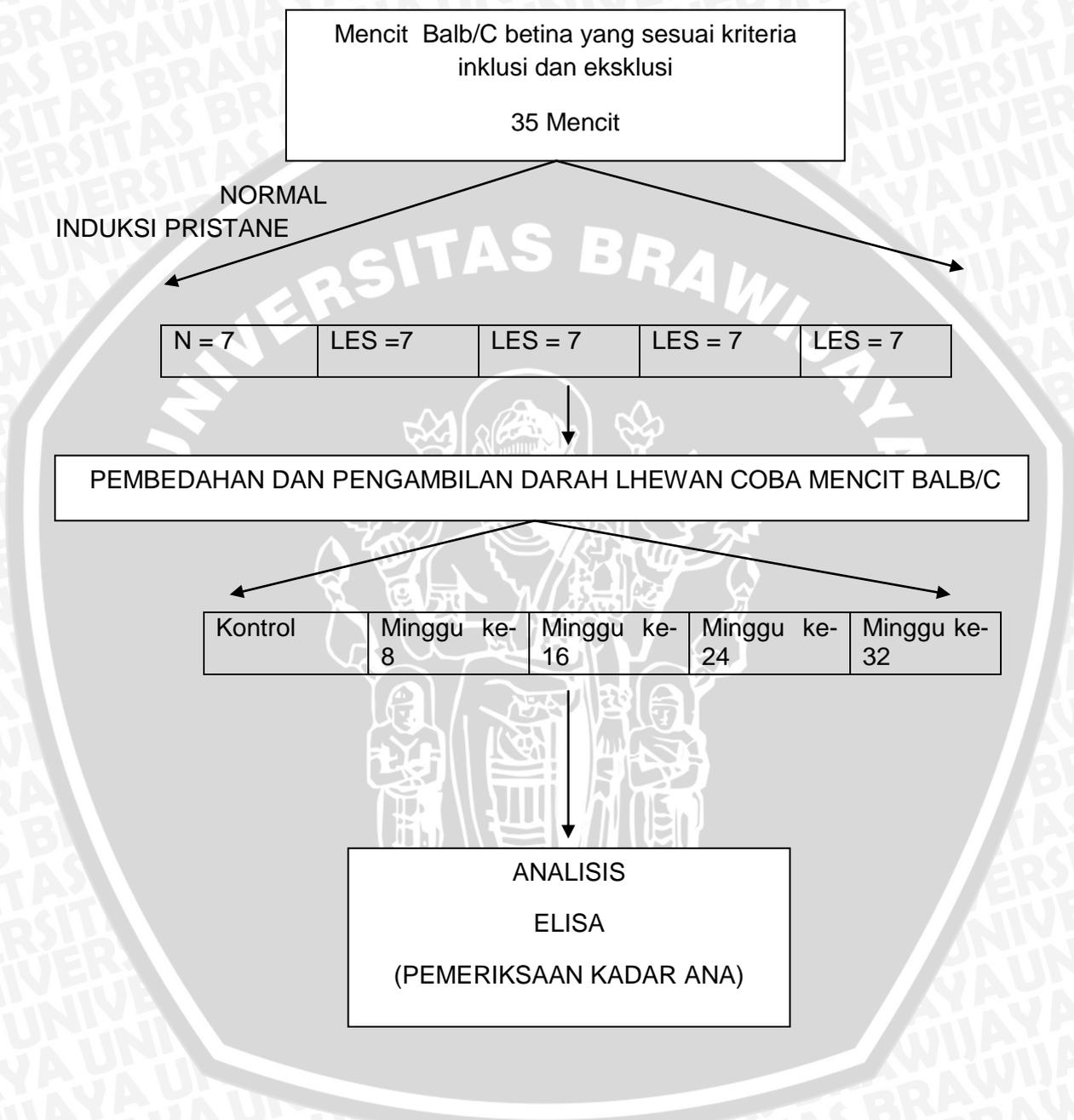
4.8 Metode Pengumpulan dan Analisis Data

Data diperoleh pada minggu ke-8, 16, 24, dan 32 paska injeksi pristane setelah dilakukan pembedahan pada periode waktu tersebut. Setiap periode akan dikumpulkan darah dari jantung mencit 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 homogenitas dan normalitas data. Serta uji perbandingan dilakukan dengan uji Kruskal Wallis dan uji Man Whitney.

Analisa data menggunakan program *SPSS 16 for Windows*.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian