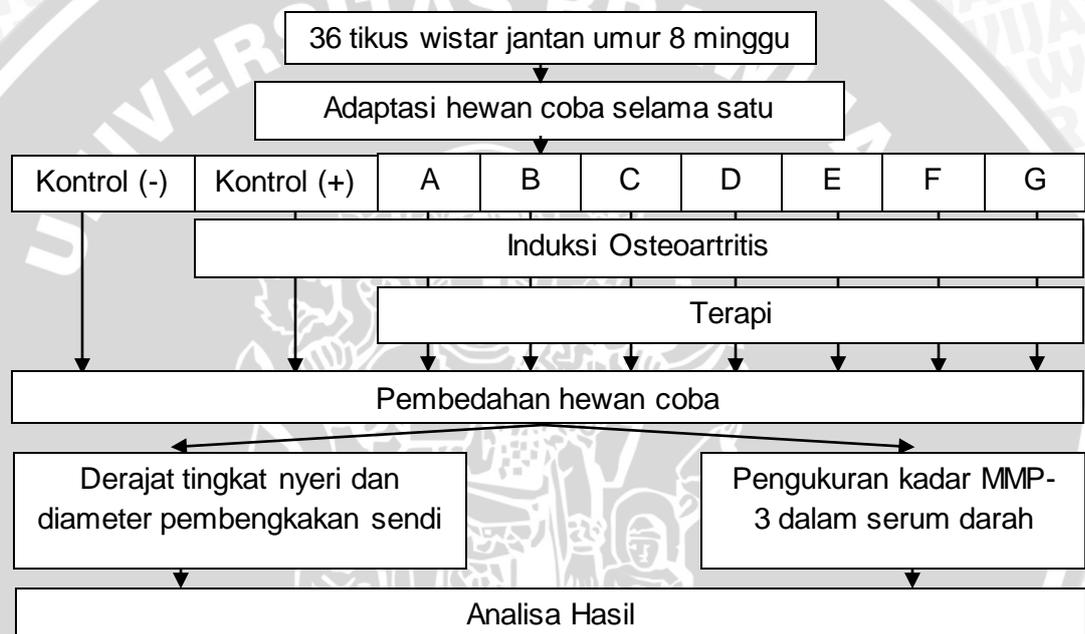


BAB IV
METODE PENELITIAN

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*.



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

4.2 Objek dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diinduksi osteoarthritis dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2003): $p(n-1) > 15$, p: jumlah perlakuan, n: jumlah ulangan. Pada penelitian ini $p = 9$ sehingga jumlah pengulangan adalah: $9(n-1) > 15$; $n-1 > 15:9$, $n > 2,67$ jadi jumlah sampel tiap perlakuan adalah 3.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penginduksian CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) dan pemberian terapi *fucoidan* dari *Sargassum sp*, kombinasi terapi *fucoidan* dan steroid, serta steroid yang dibagi dalam kelompok:

1. Kontrol Negatif: tikus tidak diinduksi CFA dan tidak diberikan terapi
2. Kontrol Positif: tikus diinduksi CFA dan tidak diberikan terapi
3. Kelompok A: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 20mg/KgBB
4. Kelompok B: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 40mg/KgBB
5. Kelompok C: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi *fucoidan* 80mg/KgBB
6. Kelompok D: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB
7. Kelompok E: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 20mg/KgBB
8. Kelompok F: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 40mg/KgBB
9. Kelompok G: tikus diinduksi CFA dan diberi terapi kombinasi dexamethason (steroid) dosis optimal 10 mg/kgBB dan *fucoidan* 80mg/KgBB

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kasar MMP-3 dan IL-1 pada serum dan imunohistokimia ekspresi CXCR4 pada sendi tikus.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Januari hingga Juli 2015 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat

1. Perawatan tikus

Alat dan bahan : Bak plastik, tutup kandang, botol air, sekam, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

2. Ekstraksi *fucoïdan* dari *Sargassum sp.*

Alat dan bahan : Tabung gelas 500 ml, stirer, tabung erlenmeyer, *whatman filter papers* (90 mm GF/D), *alumunium foil*, larutan MeOH-CHCl₃-H₂O(4:2:1), bubuk *sargassum* 25 g, *aquades*, *ultrasonic extraction*, *waterbath*, neraca analitik, serat nylon, larutan 0.03 m HCL, *refrigerator* 4°C, larutan CaCl₂, *centrifuge* 8500 rpm 4°C, *tube centrifuge*, corong, dan etanol absolut.

3. Induksi Osteoarthritis

Alat dan bahan : *Complete Freund Adjuvant* (CFA), spuit 1cc.

4. Pemberian terapi

Alat dan bahan : spuit 1 cc, kapas alkohol, *fucoïdan*, dexamethason

5. Pengukuran derajat nyeri sendi tikus

Alat dan bahan : Handuk, water bath, termometer elektronik, air panas 55°C

6. Pembedahan Tikus

Alat dan bahan : Gunting bedah 2, Pinset 2, Jarum pentul 2 set, Steroform 2, Kapas, Kloroform 20 ml, Alkohol, Wadah plastik+tutup, Spuit 3 cc

7. Pengukuran kadar IL-1 dan MMP-3 dalam serum

Alat dan bahan: serum darah tikus, alat sentrifugasi, endorf, ELISA kit, antibodi MMP-3, antibodi IL-1

8. Pengukuran ekspresi CXCR-4 pada jaringan sendi tikus dengan imunohistokimia

Alat dan bahan: coating-antigen object glass, cover glass, mikrotom, mikropipet, mikroskop, PBS, H₂O₂ 3%, triton x-100 0,25%, BSA, antibodi

primer p85, antibodi sekunder, substrat DAB, SAHRP, entellan, meyer, aquades

4.6 Definisi Istilah / Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 8 minggu yang dibeli dari laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- CFA: CFA adalah *Complete Freund's Adjuvant* yang berisi bakteri *mycobacterium tuberculosis* yang dilemahkan untuk menginduksi kondisi osteoarthritis pada hewan coba. CFA yang digunakan merupakan produksi Sigma.
- *Fucoidan*: hasil ekstraksi *fucoidan* dari rumput laut coklat (*Sargassum sp.*) dengan metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian Sugiono pada tahun 2014.
- Steroid: steroid yang digunakan adalah jenis steroid injeksi dexamethason.

4.7 Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi *fucoidan* dari *Sargassum sp.*

Alga (*Sargassum sp.*) bubuk dicampur dengan larutan MeOH-CHCl₃-H₂O (4:2:1). Alga dilarutkan dengan 0.03 M HCl (1:20 w/v) kemudian didegradasi menggunakan *ultrasonic extraction* (amplitudo 80%, 15 menit). Larutan kemudian diekstraksi menggunakan *waterbath* pada suhu 70-90°C selama 3-5 jam. Suspensi yang dihasilkan difiltrasi menggunakan serat nylon untuk memisahkan residual alga. Ekstrak kemudian dipresipitasi menggunakan 1 M CaCl₂ pada suhu 4°C semalaman. Larutan difiltrasi kemudian dicampurkan dengan etanol absolut (3 volume) pada suhu 4°C selama 8

jam. Ekstrak kemudian dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) pada suhu 4°C (Sugiono, 2014).

2. Induksi Osteoarthritis

Induksi osteoarthritis dilakukan dengan injeksi CFA intraartikular pada sendi tumit kanan tikus. Injeksi dilakukan 3 kali, yaitu injeksi pertama sebanyak 125 µl diikuti 2 kali injeksi booster setengah dosis dengan interval 2 minggu (Koo, 2013).

3. Pemberian terapi

Injeksi terapi *fucoidan*, steroid, dan kombinasi steroid/*fucoidan* intraartikular menggunakan spuit 1 cc pada tumit kanan tikus setiap 1 minggu sekali sebanyak 2 kali.

4. Pengukuran derajat nyeri sendi tikus

Derajat nyeri tikus diukur setiap minggu dengan menggunakan *hot water tail flick assay*. Variabel dependen adalah waktu yang dibutuhkan tikus untuk mengangkat ekornya dari air panas pada water bath yang diukur dengan menggunakan *stopwatch*. Suhu air dijaga tetap pada 50°C. Skor pengangkatan Hasil pengukuran merupakan rata-rata dari 3 kali pengujian pada air panas dengan interval 30 detik (Khan, 2012).

5. Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Darah keseluruhan diambil dan bagian kaki hingga lutut dipotong untuk mengambil sampel jaringan sendi tumit untuk pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan imunohistokimia.

6. Pengukuran kadar MMP-3 menggunakan ELISA

Darah dari jantung yang telah dikoleksi dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan serum. Serum yang dihasilkan kemudian dilakukan pemeriksaan kadar MMP-3 menggunakan ELISA kit.

7. Pengukuran ekspresi CXCR-4 pada jaringan sendi lutut dengan menggunakan imunohistokimia. Slide dicuci dengan PBS selama 3x5 menit, dikeringkan dengan tisu, ditetesi H₂O₂ 3% dalam methanol, diinkubasi selama 15 menit. Kemudian dilakukan blocking triton dengan triton x-100 (0,25%) dalam blocking buffer BSA. Kemudian dinkubasi selama 1 jam dicuci dengan PBS dan dikeringkan. Blocking antibodi primer dilanjutkan dengan diinkubasi semalam dalam suhu 4°C. Untuk blocking antibodi sekunder, dengan suhu ruangan, cuci PBS selama 15 menit. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder biotin yang siap digunakan 100 µL/slide. Proses dilanjutkan dengan blocking enzim SAHRP, SAHRP diberikan 100µL/slide, diinkubasi selama 40 menit, dicuci dengan PBS selama 15 menit, dicuci dengan aquades selama 10 menit. Substrat DAB dicampurkan dengan buffer DAB dengan perbandingan 1:50, diinkubasi selama 20 menit. Meyer dicampurkan dengan air dengan perbandingan 1:10 dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu dicuci dengan air selama 15 menit, dan terakhir dikeringkan lalu diberi cover dengan entelan. Selanjutnya dilakukan pembacaan hasil pada mikroskop.

4.8 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya. Analisis data dimulai dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Dilakukan uji *One-Way Anova* jika sebaran data normal dan uji *Kruskal-Wallis* jika sebaran data tidak normal. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan program SPSS 21, dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$).