

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui adanya korelasi antara perbaikan jumlah sel neuron otak yang rusak, volume infark dan fungsi motorik pada hewan model yang diinduksi stroke iskemia setelah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) dalam meregenerasi sel saraf pusat. Desain penelitian ini menggunakan *randomized pre test - post test controlled group design* untuk menguji fungsi motorik dan menggunakan *Post Test Only, Control Group Design* untuk mengukur perbaikan jumlah sel neuron yang rusak dan edema otak. Pemilihan objek penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Pada rancangan penelitian ini digunakan lima perlakuan dalam berbagai dosis. Sebelum diinduksi stroke dan setelah 14 hari penginduksian, dilakukan uji fungsi motorik menggunakan *Ladder Rung Walking Test*. Kemudian setelah 14 hari perlakuan jumlah sel neuron yang rusak serta jumlah volume infark dari tiap kelompok dievaluasi untuk mengetahui adanya korelasi antara perbaikan jumlah sel neuron otak yang rusak, volume infark dan fungsi motorik pada tikus model yang diinduksi stroke.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian eksperimental ini adalah adalah tikus jenis *Rattus norvegicus Wistar*.



4.2.2 Sampel Penelitian

Penentuan besar sample pada penelitian ini menggunakan rumus yaitu:

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

p : jumlah perlakuan, pada penelitian ini p=5

n : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah sampel adalah:

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

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

$$4 n \geq 15$$

$$n \geq 3,75$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan sampel sebanyak 4 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk penelitian ini adalah 20 ekor, dengan pembagian sebagai berikut:

Tabel 2.3 Pembagian Kelompok perlakuan

KELOMPOK	MACAM DIET DAN PERLAKUAN	JUMLAH TIKUS
Kontrol Negatif (N)	Tidak diberi perlakuan	4
Kontrol Positif (K)	Induksi stroke tanpa diberi ekstrak kulit dan biji anggur	4
Kelompok Ra	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 50mg/kgBB	4
Kelompok Rb	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 100mg/kgBB	4
Kelompok Rc	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 200mg/kgBB	4

Berdasarkan hasil diskusi yang telah disepakati pada sidang etik, jumlah sampel tiap kelompok ditambah 2 sampel menjadi 6 ekor. Hal ini didasarkan pada pertimbangan bahwa perlakuan pada penelitian ini bersifat invasif. Sehingga penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 30 ekor tikus.

4.2.3 Kriteria Sampel

Sampel penelitian diambil secara random sampling dengan kriteria inklusi, kriteria eksklusi dan kriteria *drop out* sebagai berikut:

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus jenis *Rattus norvegicus* Wistar berjenis kelamin jantan
- b. Umur 8-10 minggu
- c. Berat badan rata-rata 150 gram
- d. Tikus berwarna putih sehat, aktif, bertingkah laku normal dan tidak ada kelainan anatomik

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian

4.2.3.3 Kriteria Drop Out

Tikus sesuai kriteria eksklusi dinyatakan *drop out* dan diganti tikus lain sesuai kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sample.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (independen)

- Pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*)

4.3.2 Variabel Tergantung (dependen)

- Jumlah sel neuron secara mikroskopis dengan metode Hematoksilin dan Eosin
- Volume Infark secara makroskopis dengan metode Hematoksilin dan Eosin

- Uji fungsi motorik menggunakan *Ladder Rung Walking Test*

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakologi, Fisiologi, Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, dan Rumah Sakit Islam Aisyiah.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 minggu yaitu pada bulan Maret sampai April 2013.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

- Kandang untuk pemeliharaan tikus beserta tempat makan dan minum.
- Alat pembuatan makanan tikus terdiri dari timbangan analitik, baskom plastik, pengaduk, nampan, *hand scoen*, gelas ukur, dan penggiling.
- Alat Ekstraksi kulit dan biji anggur: alat Rotafavor, neraca analitik, gelas ukur 250 ml, erlenmeyer 250 ml, gelas kimia 500 ml, wadah maserasi, corong, botol semprot, dan kain kasa.
- Alat uji *Thin Layer Chromatography* (TLC): TLC scanner, cawan porselen, *aufhauser*, *hot plate*, labu didih, kondensor, eksikator, oven, tanur, alat pendorong, dan *hitter mantel*.

- Alat induksi stroke menggunakan teknik *Unilateral Carotid Artery Occlusion*: alat pencukur bulu, alat jahit, scapel, alas bedah, spuit 5 cc, kasa steril.
- Alat sonde ekstrak kulit dan biji anggur: spuit 1 cc, spuit 5 cc, gelas ukur, lemari pendingin.
- Alat untuk pembuatan *slide* histo patologi: *water bath*, *tissue texture prosesor*, *microtome*.
- Alat pengecatan dan penghitungan jumlah sel neuron yang rusak dan volume infark: kaca benda, gelas ukur, spatula, oven, *deckglas*, kamera Olympus dp 71, mikroskop bx 51, dan software countcell.
- Penghitungan volume infark: menggunakan kamera Olympus XC 10 dan software *dotslide microscope*.
- Alat uji fungsi motorik dengan menggunakan *Ladder Rung Walking Test*: alat *Ladder Rung Walking Test* yang terdiri dari 2 mika berbentuk persegi panjang dengan ukuran 1 m x 20 cm yang diberi lubang pada sisi panjang mika dengan jarak 1 cm dan diberi besi silinder dengan diameter 3 mm dan panjang 15 cm yang disusun dengan jarak tertentu untuk tikus berjalan di atasnya.
- Alat pengambilan darah tikus melalui ekor: alat pengambilan darah, spuit 1 cc, dan kasa steril.

4.5.2 Bahan

- Diet berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/PARS (air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat) 66.6% dan tepung terigu 33.4% (Murwani *dkk.*, 2006)

- Bahan Ekstraksi kulit dan biji anggur: aluminium foil, aquadest (H₂O), es batu, kulit dan biji anggur yang telah dikeringkan dan dihaluskan, etanol, air dan tissue.
- Bahan *Thin Layer Chromatography* (TLC): ekstrak kulit dan biji anggur, hexane, etil asetat, toluene, oli vacuum, dan silica gel.
- Bahan induksi stroke menggunakan teknik *Unilateral Carotid Artery Occlusion*: ketamine, benang prolene 6.0, jarum jahit, benang catgut, alkohol 70%, dan antiseptik.
- Pemberian sonde ekstrak biji dan kulit anggur dengan dosis 50, 100, dan 200 mg/kgBB dan aquades untuk melarutkan ekstrak.
- Pembuatan *slide*: paraformaldehid 4%, jaringan otak tikus.
- Pengecatan sel neuron yang rusak dan volume infark: larutan sylol, alkohol 96%, cat Harris Hematoksilin, alcohol asam 1%, ammonia, eosin 1%, alkohol 80% dan 96%.
- Pengambilan darah tikus melalui ekor: air hangat.

4.6 Definisi Operasional

1. Kulit dan biji anggur didapatkan dari perkebunan anggur Agro Surya di Batu, Malang, Jawa Timur. Pembuatan ekstrak kulit dan biji anggur dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Metode pengestrakan adalah maserasi dengan mencampurkan hasil gilingan dalam 80% etanol dan 20% air.
2. Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tikus berusia antara 8-10 minggu dengan berat badan rata-rata 150 gram.

3. Metode penginduksian stroke menggunakan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion*. Pengikatan arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna dilakukan pada sisi kiri.
4. Pengukuran kadar marker MMP-9, melalui darah yang diambil lewat ekor tikus. Serum kemudian dianalisa menggunakan Total MMP-9 Quantikine ELISA kit (R&D systems, United States of America).
5. Penghitungan parameter jumlah neuron adalah dengan menghitung jumlah neuron yang rusak akibat iskemik. Neuron rusak ditandai dengan adanya gambaran perikarion yang mengkerut, nukleus piknosis, *eosinophilic cytoplasm*, dan vakuolisasi pada pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Penghitungan dilakukan secara manual dengan bantuan kamera Olympus dp 71, mikroskop bx 51, dan software countcell.
6. Penghitungan parameter volume infark adalah dengan menghitung luas daerah yang berwarna merah muda pucat pada pewarnaan Hemaktosilin dan Eosin dengan menggunakan Olympus XC 10 dan software *dotslide microssope*.
7. Pengukuran fungsi motorik hewan coba menggunakan tes berupa *ladder rung walking test*. Tes tersebut merupakan suatu tes yang menilai secara spesifik kekuatan dari ekstremitas dari hewan coba (Schaar *et al*, 2009).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Dimulai dengan persiapan alat dan bahan panelitian yang akan digunakan meliputi kandang anyaman kawat, sekam, tempat makan dan minum,

pakan tikus, alkohol 70%, tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*), dan dilakukan seleksi tikus berdasarkan kriteria inklusi.

4.7.2 Pembagian Kelompok Perlakuan

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok:

1. Kelompok 1: Kelompok tikus kontrol negatif tanpa perlakuan
2. Kelompok 2: Kelompok tikus kontrol positif yang diinduksi stroke iskemik
3. Kelompok 3: Kelompok tikus yang diinduksi stroke iskemik dan diberi sonde ekstrak kulit dan biji anggur 50mg/kgBB selama 14 hari
4. Kelompok 4: Kelompok tikus yang diinduksi stroke iskemik dan diberi sonde ekstrak kulit dan biji anggur 100mg/kgBB selama 14 hari
5. Kelompok 5: Kelompok tikus yang diinduksi stroke iskemik dan diberi sonde ekstrak kulit dan biji anggur 200mg/kgBB selama 14 hari

4.7.3 Pemberian Pakan Tikus

Seluruh kelompok tikus diberikan diet berupa pakan standart yang terdiri dari pakan ayam/PARS (air, protein, lemak, serat, abu, Ca, Phospor, antibiotika, coccidiostat) 66.6% dan tepung terigu 33.4% (Murwani *dkk.*, 2006)

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Kulit dan Biji Anggur

Ekstrak kulit dan biji anggur dibuat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bahan kulit dan biji anggur didapatkan dari kebun anggur Argo Surya, Batu, Malang. Kulit dan biji anggur dikeringkan terlebih dahulu dengan sinar matahari. Untuk mempermudah proses ekstraksi, kulit dan biji anggur digiling sehingga bahan-bahan tersebut memiliki tekstur yang lebih halus.

Ekstraksi kulit dan biji anggur dilakukan dengan metode maserasi. Kulit dan biji anggur yang sudah digiling diletakkan di dalam labu erlenmeyer masing-masing sejumlah 100 gram. Maserasi dilakukan dengan merendam hasil penggilingan kulit dan biji anggur di dalam larutan yang terdiri dari 80% etanol dan 20% air selama 72 jam. Larutan tersebut digunakan untuk proses maserasi karena memiliki fungsi untuk melarutkan resveratrol. Setelah proses maserasi selesai, cairan yang berada di atas labu Erlenmeyer diletakkan di dalam alat yang bernama *rotary evaporator* hingga air tidak lagi menetes. Hasil ekstraksi tersebut dipanaskan kembali di dalam oven dengan suhu 60^o C selama 15 menit.

4.7.5 *Thin Layer Chromatography (TLC)*

Proses *thin layer chromatography* atau yang sering disebut TLC adalah suatu proses pemisahan suatu senyawa dari suatu campuran atau mengidentifikasi keberadaan suatu senyawa dalam suatu ekstrak. Proses ini memiliki 2 bagian yaitu *mobile phase* dan *stationary phase*. *Mobile phase* yang terdiri dari ekstrak yang akan dipisahkan dan *stationary phase* yang terdiri dari *silica plate*. Dalam proses TLC dibutuhkan eluen yang nantinya akan menggerakkan ekstrak. Eluen merupakan suatu campuran beberapa senyawa yang berfungsi untuk memisahkan senyawa dari suatu ekstrak. Eluen biasanya terdiri dari beberapa senyawa yang biasanya disesuaikan dengan senyawa yang akan dipisahkan, dimana dalam penelitian ini adalah resveratrol.

Sebelum proses eluasi dilakukan, ekstrak yang akan diproses akan diencerkan terlebih dahulu dengan perbandingan 1:1 (ekstrak : etanol). 1 ml ekstrak yang sudah diencerkan ditetaskan pada garis awal *silica plate* menggunakan mikropipet. Lalu eluen yang terdiri atas 50% heksan dan 50% etil asetat dimasukkan kedalam sebuah *chamber glass* yang nantinya merupakan

tempat terjadinya eluasi. *Silica plate* yang sudah ditetesi ekstrak dimasukkan ke dalam *chamber* dengan posisi miring 30° menempel pada dinding *chamber glass*. Setelah eluasi sudah sampai pada garis akhir yang terletak di *silica plate*, *silica plate* dikeringkan di lemari asam. Jika *silica plate* sudah kering, *silica plate* dibaca pada gelombang 254 nm dan 318 nm untuk melihat ada atau tidaknya *spot* yang merupakan tanda keberadaan resveratrol dalam ekstrak kulit dan biji anggur.

4.7.6 Studi Pendahuluan

Studi pendahuluan bertujuan untuk membuktikan bahwa oklusi karotis interna dan eksterna yang dilakukan untuk penginduksian stroke berhasil mengakibatkan stroke iskemik pada tikus. Studi pendahuluan ini menggunakan 3 ekor tikus yang diinduksi dengan cara yang sama, yaitu diikat pada arteri karotis interna dan eksterna selama 45 menit. Pada percobaan dengan ketiga tikus tersebut, tikus kedua dan ketiga terbukti mengalami stroke. Kemudian seluruh tikus dieutanasia, lalu jaringan otak diambil untuk dilakukan uji makroskopis. Tujuannya adalah untuk mengetahui adanya daerah iskemik pada jaringan otak, dengan menggunakan metode pewarnaan H&E. Dari uji makroskopis jaringan otak tersebut, terbukti bahwa dua dari tiga tikus yang diinduksi stroke berhasil mengalami stroke iskemik.

4.7.7 Aklimatisasi

Pertama-tama, seluruh kelompok tikus ditimbang berat badannya dan kemudian dilakukan randomisasi dalam pemilihan kelompok perlakuan agar setiap tikus memiliki kesempatan yang sama untuk mendapat perlakuan. Kemudian, tikus diaklimatisasi selama 12 hari. Selama aklimatisasi tikus

diberikan minum dan pakan 30 gr/hari dengan komposisi 13,32 gr PARS + 16,68 gr terigu + 10 ml air. Penggantian sekam dilakukan 3 hari sekali. Di akhir aklimatisasi, berat badan tikus ditimbang kembali dan beratnya berkisar antara 150-200 gram.

4.7.8 Induksi Stroke

Metode induksi stroke dilakukan dengan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion*, yaitu dengan melakukan ligasi pada arteri karotis interna dan eksterna tikus pada sisi kiri. Prosedurnya sebagai berikut:

1. Tikus dianestesi menggunakan ketamin dengan dosis 40 mg/kgBB. Kemudian tikus difiksasi dalam posisi supinasi di atas tempat pembedahan
2. Selanjutnya bulu pada bagian leher dicukur lalu kulit bagian leher dibersihkan menggunakan alkohol 70% dengan kapas dan diberi antiseptik untuk mencegah infeksi saat melakukan insisi
3. Setelah itu dilakukan insisi dengan menggunakan skalpel pada garis tengah leher secara vertikal sepanjang 2–3 cm
4. Mencari arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna yang terletak di sebelah lateral trakea
5. Meligasi arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna selama 45 menit dengan menggunakan benang prolene ukuran 6.0
6. Setelah 45 menit, ikatan benang prolene dilepas. Lalu luka insisi tersebut ditutup dan dijahit dengan menggunakan benang catgut. Setelah itu luka jahitan diolesi dengan antiseptik, kemudian luka ditutup dengan kasa steril.
7. Tikus lalu disonde dengan dextrose 10%

8. Pada hari berikutnya darah tikus diambil melalui ekor untuk dicek kadar marker MMP-9 yang bertujuan untuk membuktikan tikus tersebut mengalami stroke

4.7.9 Pemberian Ekstrak

Pemberian ekstrak dilakukan dengan cara sonde/*oral gavage* selama 14 hari. Ekstrak kulit dan biji anggur dilarutkan dengan aquades dengan perbandingan 99:1 (aquades : ekstrak). Pengenceran dilakukan agar tingkat kepekatan ekstrak tidak terlalu tinggi sehingga mempermudah penyerapan ekstrak oleh hewan coba.

4.7.10 Pengambilan sampel

Sehari setelah hari terakhir pemberian sonde ekstrak kulit dan biji anggur, tikus dieutanasia dengan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi eter. Setelah itu, dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan otaknya. Otak kemudian dimasukkan dalam larutan fiksasi, yaitu larutan PFA dengan konsentrasi 4% untuk selanjutnya dilakukan evaluasi.

4.7.11 Penghitungan Jumlah Sel Neuron

Pemotongan jaringan dilakukan secara koronal pada jaringan otak yang telah diparafin. Jaringan otak yang diamati mulai dari kiasma optikus dan ke arah anterior. Jaringan otak dipotong dengan menggunakan mikrotom setebal 5 μ m untuk mengevaluasi morfologinya. Pada akhirnya didapatkan 3 preparat yang kemudian akan dipilih 1 preparat. Tujuannya adalah untuk mencari daerah mana yang mengalami kerusakan untuk kemudian dihitung neuronnya. Pengecatan yang digunakan adalah metode pengecatan H&E.

Evaluasi dilakukan dengan menghitung jumlah sel neuron yang rusak.

Neuron yang rusak ditandai dengan adanya perikarion yang mengkerut, nukleus piknosis, *eosinophilic cytoplasm*, dan vakuolisasi. Penghitungan secara kuantitatif dilakukan dengan menjumlahkan neuron yang rusak dalam 10 lapangan pandang dari potongan preparat yang didapatkan. Dalam melakukan pengamatan, digunakan mikroskop cahaya kamera Olympus dp 71 dan mikroskop bx 51 dengan pembesaran 400 kali yang dihubungkan dengan komputer. Setelah itu penghitungan dilakukan secara manual dengan menggunakan software countcell. Kemudian sel neuron rusak yang ditemukan dari 10 lapangan pandang dijumlahkan, lalu dirata-rata sesuai dengan kelompok perlakuan.

4.7.12 Penghitungan Volume Infark

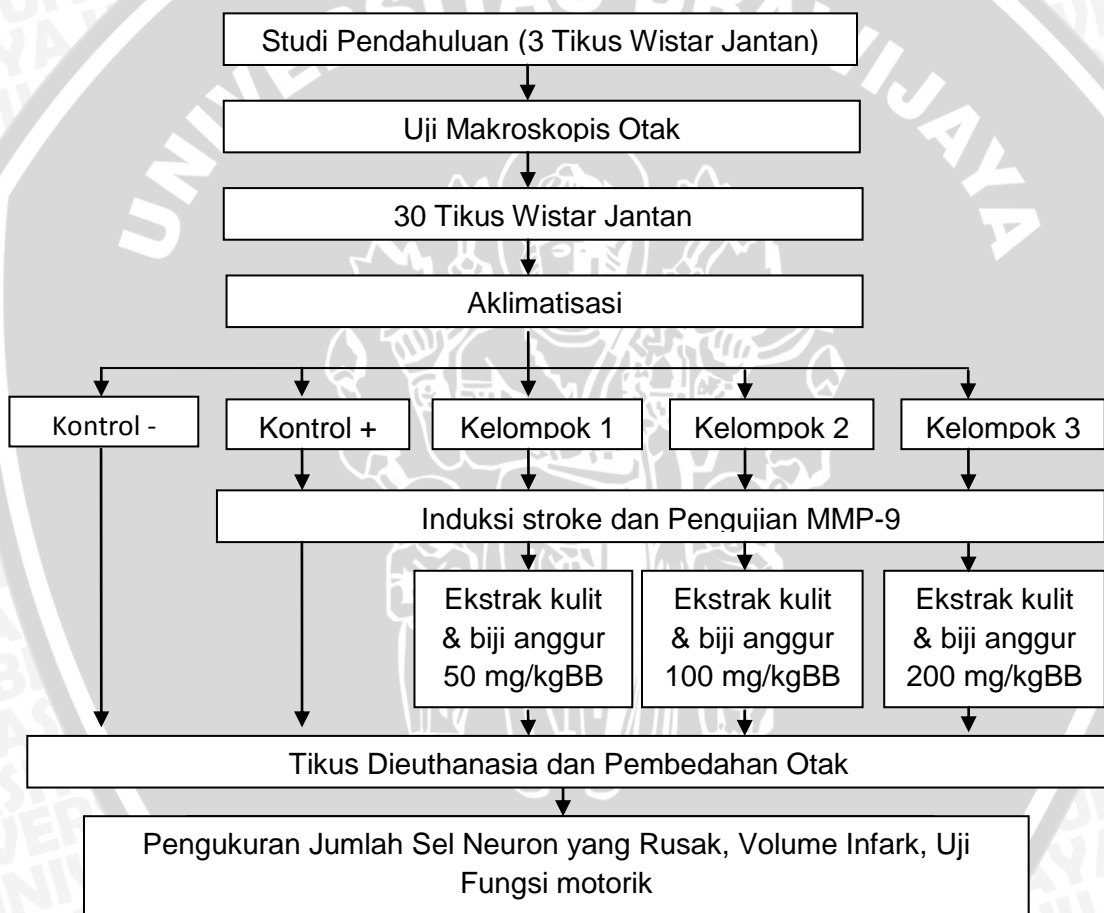
Volume infark merupakan area yang rusak pada otak akibat stroke iskemik. Area infark ditandai dengan area yang berwarna pucat pada spesimen atau area yang berwarna merah muda pucat pada pewarnaan Hemaktosilin dan Eosin. Volume infark dihitung dengan menggunakan rumus $(L1+L21+L41+L61)*200\mu\text{m}$. L adalah luas area infark dan angka di belakang L menunjukkan potongan ke berapa. Sebagai contoh, L21 berarti luas area infark pada potongan ke-21. L ditentukan menggunakan kamera Olympus XC 10 dan software *dotslide microscope*. Potongan pertama dihitung mulai dari kiasma optikus dan jarak antar potongan adalah $10\mu\text{m}$.

4.7.13 Ladder Rung Walking Test

Untuk menilai fungsi motorik hewan coba, peneliti menggunakan uji *ladder rung walking test*. Pada uji ini, tikus berjalan pada besi berbentuk silinder yang disusun secara teratur dengan jarak tertentu sepanjang 1m Tikus berjalan

di atasnya dan diamati gerakan kaki kiri, kanan, dan jumlah langkah tikus. Apabila tikus terpeleset maka ini merupakan tanda-tanda kelemahan motorik tikus (Schaar *et al*, 2010). Uji fungsi ini dilakukan setelah penginduksian stroke dan setelah diberi ekstrak selama 14 hari. Kemudian skor dihitung dari selisih skor untuk mengetahui tingkat perbaikan fungsi motorik.

4.7.14 Alur Penelitian



4.8 Uji Analisis Data

Data yang diambil berupa biomarker MMP-9, penghitungan skor fungsi motorik dengan Ladder Rung Walking Test dan pengamatan jaringan histoPA untuk menghitung jumlah sel neuron yang rusak, dan volume infark. Data MMP9



diambil dari serum darah tikus 1 hari setelah penginduksian stroke iskemik, data skor fungsi motorik diambil setelah dilakukan induksi stroke iskemik dan setelah pemberian ekstrak biji dan kulit anggur selama 14 hari, sedangkan jaringan histoPA diambil setelah pemberian ekstrak biji dan kulit anggur selama 14 hari. Analisis yang dilakukan adalah uji korelasi Pearson. Jika didapatkan $r=0$, maka dapat dikatakan tidak ada hubungan antar variabel, $r \neq 0$ dapat dikatakan terdapat hubungan antar variabel Uji Pearson digunakan juga untuk menilai kekuatan hubungan. Kekuatan ini diukur dengan interval kekuatan 0 berarti tidak ada korelasi, 0,00-0,25 terdapat korelasi yang sangat lemah, 0,25-0,50 terdapat korelasi yang cukup, 0,50-0,75 terdapat korelasi kuat, 0,75-0,99 terdapat korelasi yang sangat kuat, 1 berarti terdapat korelasi sempurna. Uji statistik dicek dengan SPSS 22.

