

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus strain Wistar jantan usia 6-7 minggu. Tikus Wistar jantan dipilih sebagai hewan coba karena terbukti dari penelitian sebelumnya tikus strain ini dapat terinduksi Parkinson dengan baik (Przedborski, 2001). Pemilihan usia 6-7 minggu dikarenakan pada usia tersebut masih belum terdapat pengaruh dari hormon-hormon pertumbuhan dan seksual yang dapat menjadi faktor perancu (*confounding*) selama penelitian.

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

Kriteria inklusi:

1. Tikus strain Wistar jantan
2. Tikus berwarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.

3. Umur 6-7 minggu
4. Berat rata-rata 150 gram

Kriteria eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

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:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t : jumlah perlakuan, r : jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$r-1 \geq 15:4$$

$$r = 3.75 + 1 = 4.75$$

Berdasarkan perhitungan diatas dapat disimpulkan bahwa jumlah pengulangan yang diperlukan adalah 4.75 = dibulatkan menjadi 5 pengulangan.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret sampai dengan Mei 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan sehingga tikus Wistar jantan dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok dilakukan berdasarkan penginduksian Parkinson dan pemberian *Saccharomyces cerevisiae*. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Tikus Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif	tidak diberikan perlakuan apapun
Kontrol Positif	Injeksi Rotenone 3mg/kg BB tanpa diberikan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kelompok A	Injeksi Rotenone 3 mg/kgBB + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 18 mg/kgBB
Kelompok B	Injeksi Rotenone 3 mg/kgBB + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 36 mg/kgBB
Kelompok C	Injeksi Rotenone 3 mg/kgBB + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 72 mg/kgBB

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi *alpha synuclein* pada bagian *substantia nigra* jaringan otak tikus.

Variabel kendali atau variabel independen adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti dan berhubungan langsung dengan perubahan yang terjadi pada variabel terikat atau variabel dependen.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah pemberian *Saccharomyces cerevisiae*

4.5 Definisi Operasional

- Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan berusia 6-7 minggu. Tikus diperoleh dari peternakan tikus penelitian di Purwokerto.

- Induksi parkinson

Induksi Parkinson pada hewan coba menggunakan rotenone yang telah menjadi standar sebagai bahan penginduksi Parkinson pada berbagai penelitian. Rotenone diinjeksikan secara subkutan 2 hari sekali selama 12 hari. Dosis yang diberikan sebanyak 3 mg/kgBB setiap injeksi.

- Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae dengan dosis 18 mg/kgBB; 36 mg/kgBB; 72 mg/kgBB untuk kelompok I, II, dan III dilarutkan dalam aquades. Setiap kali pemberian dosis perlakuan pada satu hewan coba, *Saccharomyces cerevisiae* dilarutkan dalam 2 cc aquades kemudian di berikan ke tikus menggunakan sonde makan tikus.

- Bagian jaringan yang diamati diambil dari jaringan otak tikus bagian *substansia nigra*

4.6 Bahan dan Alat

1. Perawatan tikus

Alat : kandang tikus, tempat minum, timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan

Bahan : pelet, terigu, air, dan sekam

2. Penginduksian Parkinson pada Hewan Coba

Alat : spuit insulin, kassa, alkohol

Bahan : *Rotenone*, *olive oil*

3. Pembuatan Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Alat : gelas erlenmeyer, timbangan

Bahan : *Saccharomyces cerevisiae*, akuades

4. Pemberian Larutan *Saccharomyces*

Alat : sonde makan tikus

Bahan : larutan *Saccharomyces cerevisiae*

5. Pembedahan tikus

Alat : Gunting bedah, steroform 2, pinset 2, kapas, jarum pentul 2 set

Bahan : Kloroform 20 ml, formalin 10% 200 ml, wadah plastic+tutup25 buah, alcohol

6. Pembuatan Preparat Histopatologi Anatomi Jaringan Otak Tikus

Alat : incubator, object glass, cover glass, mikrotom, pinset, dan *Automatic Tissue Processing*

Bahan : formalin 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, parafin, alkohol 70%

7. Imunohistokimia *Alpha synuclein*

Alat : *blue tip*, *yellow tip*, peralatan gelas, gelas obyek, mikroskop cahaya

Bahan : Imunohistokimia kit, antibodi primer dan sekunder, PBS, etanol

4.7 Prosedur Penelitian

1. Adaptasi

Adaptasi hewan coba dilakukan selama 1 minggu. Selama proses adaptasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing-masing tikus mendapatkan 30 gram makanan. Hewan coba juga diberikan minuman secara *ad libitum*.

2. Pemberian *Rotenone* pada Hewan Coba

Penginduksian Parkinson menggunakan metode yang digunakan pada penelitian oleh Sharma *et al.*, (2012) menggunakan rotenone yang diinjeksi secara subkutan. Injeksi dilakukan 6 dosis dalam 12 hari. Setiap injeksi dibutuhkan dosis sebesar 3mg/kgBB (Sharma *et al.*, 2012).

3. Penentuan Dosis *Saccharomyces cerevisiae*

Berdasarkan penelitian Ito *et al.*, 2009, *Beta Glucan* sebesar 8mg/kgBB pada tikus dapat meningkatkan G-CSF secara signifikan. Kandungan *Beta Glucan* pada *Saccharomyces cerevisiae* sebesar 45%-98%. Berarti didapatkan 45mg *Beta Glucan* dalam 100mg *Saccharomyces cerevisiae* (Kusmiati *et al.*, 2007).

KONVERSI

$$45 : 8 = 100 : X$$

$$45 X = 800$$

$$X = 17,78 \sim 18 \text{ mg/kgBB (dosis perlakuan 1)}$$

Jadi 8 mg/kgBB bisa didapatkan dari 18 mg/kgBB *Saccharomyces cerevisiae*

Dosis selanjutnya ditentukan menggunakan deret hitung ($2n$), jadi :

Dosis perlakuan 2 = 36 mg/kgBB

Dosis Perlakuan 3 = 72 mg/kgBB

4. Pembuatan Larutan *Saccharomyces cerevisiae*

Metode pembuatan larutan menggunakan metode dari Antilla, 2004. Hal tersebut didasarkan bahwa *Beta-glucan* merupakan bahan yang larut air (Antilla, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* dibuat menjadi larutan dengan cara melarutkannya dengan akuades. Pertama-tama, *Saccharomyces cerevisiae* ditimbang sesuai dosis perlakuan yaitu 18 mg/kgBB, 36 mg/kgBB dan 72 mg/kgBB sampel kering. Masing-masing dosis tersebut ditambah dengan akuades 2 cc untuk satu hewan coba pada masing-masing perlakuan. Larutan dikocok sampai benar-benar tercampur. Pemberian larutan ke tikus dilakukan dengan sonde makan tikus setiap hari selama 4 minggu.

3. Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Tikus yang sudah diberi anestesi diletakkan di atas sterofoam, difiksasi, lalu dibedah mulai dari kepala. Setelah itu, dilakukan pengambilan organ otak dan difiksasi ke dalam formalin 10%.

4. Pembuatan Preparat Histopatologi Anatomi Jaringan Otak Tikus

Embedding

Organ direndam dalam larutan fiksatif berupa Formalin/PAF (selama 1-7 hari). Organ kemudian direndam dalam etanol 70% selama minimal 24 jam, dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam. Selanjutnya organ direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Proses ini dilanjutkan dengan perendaman dalam etanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda sebanyak 3 kali. Organ kemudian direndam dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C dengan proses sebagai berikut. (1) Direndam dalam xylol, parafin sebanyak 3 kali (2) dilanjutkan dengan *embedding* dengan mencelupkan organ dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, parafin akan memadat dan organ berada dalam blok parafin.

Coating Object glass

Object glass (baru) ditandai dengan kikir dan direndam dalam alkohol 70% minimal semalam. *Object glass* kemudian dikeringkan dan dihindarkan dari debu. Selanjutnya *object glass* dicelupkan selama 30 detik dalam 0,5% gelatin hangat yang dilarutkan dalam aquades lalu diberikan gelatin 0,5% sebanyak 100 ml untuk 100 *object glass*. *Object glass* kemudian dikeringkan dalam ruang tertutup dan dapat digunakan dalam dua hari.

Pembuatan Preparat Organ

Organ pada blok parafin hasil *embedding* dimasukkan ke penjepit (*block holder*) mikrotom dan diatur kesejajaran antara permukaan potong

dengan mata pisau mikrotom. Pemotongan diawali dengan mengatur ketebalan irisan diatas 10 μm untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Organ diiris dengan ukuran 4 μm . Pemotongan yang bagus akan menghasilkan bentuk potongan seperti pita. Irisan diambil dengan pinset dan dimasukkan air (suhu ruang) untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat. Hasil irisan dipindahkan dengan jarum bertangkai ke dalam air hangat (38-40°C) untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan diatas hotplate (38-40°C) sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator suhu 36-40°C selama 24 jam.

5. Imunohistokimia *alpha synuclein*

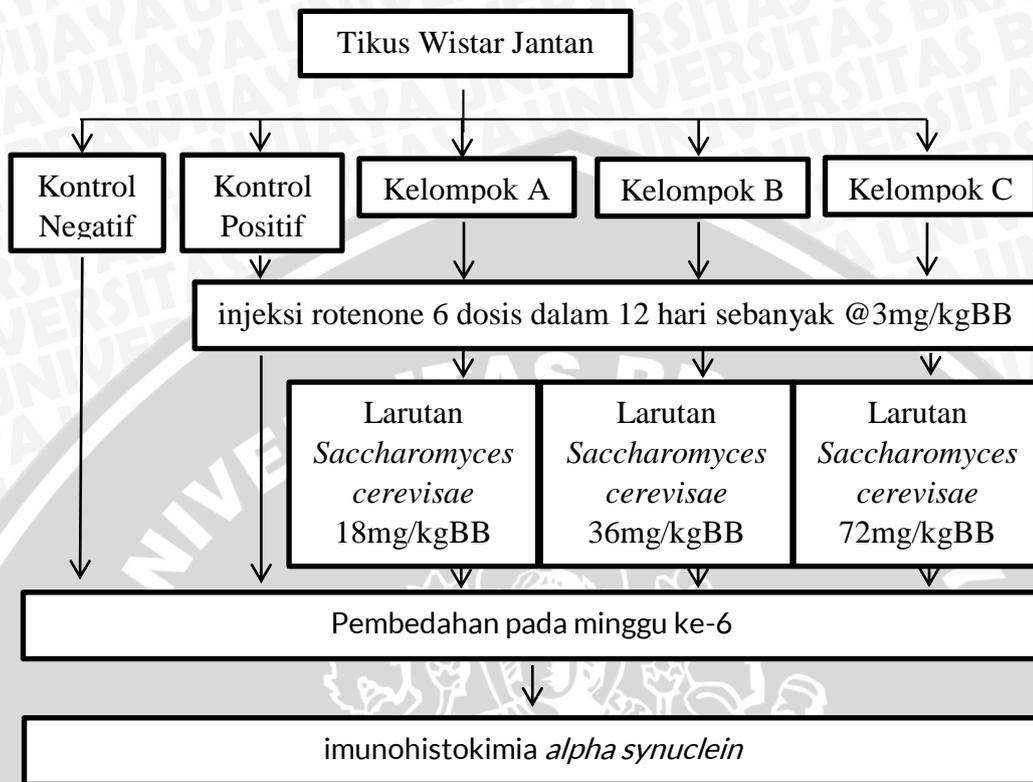
Preparat yang sudah di proses akan dilakukan deparafinisasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya dilakukan rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95 % dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit. Preparat direndam dalam *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya preparat diinkubasi dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit. Preparat direndam di dalam antibodi monoclonal anti-*alpha synuclein* 25°C selama 10 menit. Preparat dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) selama 5 menit kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder 25°C selama 10 menit lalu cuci preparat dengan PBS selama 5 menit. Preparat kemudian diinkubasi kembali dengan peroksidase 25°C selama 10 menit lalu cuci preparat dengan

PBS selama 5 menit. Inkubasi preparat yang terakhir menggunakan kromogen DAB (*Diaminobenzinidine*) 25°C selama 10 menit. Hasil semua inkubasi preparat diwarnai dengan Hematoxylin Eosin. Preparat kemudian dibersihkan dan ditetesi dengan *mounting media*. Preparat yang telah jadi ditutup menggunakan coverslip. Sel saraf yang mengekspresikan *alpha synuclein* (warna coklat) diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 x. Setiap pengamatan pada seluruh kelompok didokumentasikan menggunakan foto mikroskop. Sel otak yang mengekspresikan *alpha synuclein* dihitung pada tiap perlakuan sebanyak 4 lapang pandang (Yamada *et al.*, 2004). Kemudian jumlah sel otak pada masing-masing lapang pandang yang mengekspresikan *alpha synuclein* dihitung dengan persamaan :

$$\frac{\text{Jumlah sel otak dengan ekspresi } \alpha \text{ synuclein positif}}{\text{Jumlah sel otak dalam 1 lapang pandang}} \times 100$$



Alur kerja penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Kerja Penelitian

4.8 Pengolahan Data

Hasil perhitungan jumlah sel otak di bagian *substantia nigra* otak tikus dianalisa secara statistik menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)* dengan menggunakan uji sebagai berikut :

- Uji normalitas (uji kolmogorov-smirnov) : bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki sebaran normal. Jika sebaran data normal, analisa dilanjutkan dengan uji ANOVA. Jika sebaran data tidak normal, digunakan uji non parametrik.
- Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varian homogen, analisa dilanjutkan dengan anova. Jika varian tidak homogen,

digunakan uji non parametrik.

- Uji *One-way Anova*: bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata masing-masing kelompok. Uji alternatif (non parametrik): uji Kruskal-Wallis.
- Analisis *post hoc (Tukey HSD)*: bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes anova. Analisis *post hoc* untuk non parametrik (Kruskal-Wallis): uji Mann-Whitney.
- Uji korelasi Pearson : bertujuan untuk menguji apakah terdapat korelasi yang signifikan antara pemberian *Saccharomyces cerevisiae* terhadap jumlah ekspresi *alpha synuclein* pada bagian *substantia nigra* otak tikus.

