

Lampiran 1

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Febrilla Dejanera
NIM : 105070100111014
Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa tugas akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Desember 2013

Yang membuat pernyataan,



(Febrilla Dejanera)

NIM. 105070100111014

Lampiran 2



Lampiran 3

Metode Perlakuan *Rattus norvegicus* Varian Wistar Jantan selama Penelitian (Sebelum, Selama, dan Sesudah Pemberian Radiasi Sinar Gamma)

I. Sebelum Pemberian Radiasi Sinar Gamma

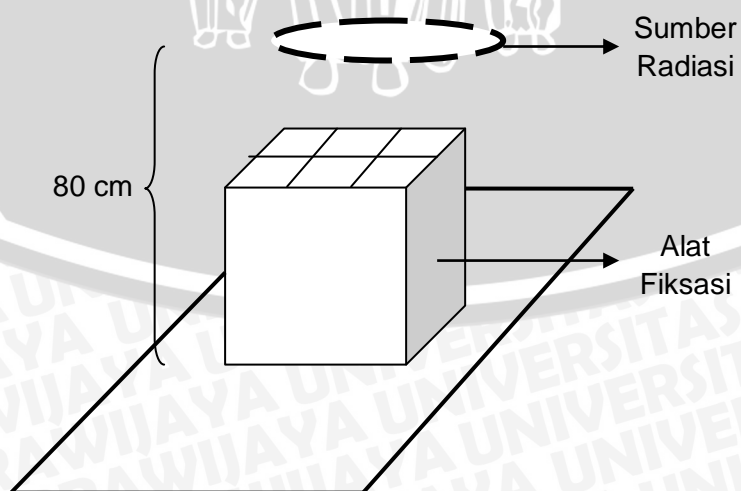
Perlakuan tikus sebelum diberi radiasi sinar gamma adalah adaptasi mulai dari hari ke-1 sampai dengan hari ke-3. Semua sampel penelitian sebanyak 27 ekor tikus ditempatkan di dalam 6 kandang berukuran 40 x 31 x 14 sentimeter, di mana tiap kandang berisi 4-5 ekor tikus. Tikus diberi makan bolus pellet dan diberi air minum yang berasal dari PDAM Kota Malang. Pakan dan air minum tikus diberikan secara tidak terbatas (*ad libitum*). Penggantian sekam kandang tikus dilakukan seminggu sekali. Tikus dipelihara secara normal selama 3 hari masa adaptasi. Proses adaptasi ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

II. Selama Pemberian Radiasi Sinar Gamma

Perlakuan tikus selama pemberian radiasi sinar gamma pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-9 dibedakan menurut kelompok perlakuan pemberian dosis radiasinya. Terdapat 3 kelompok perlakuan dari semua sampel penelitian yang berjumlah 27 ekor tikus, yang berarti terdapat 9 ekor tikus pada tiap kelompok.

- a. Tikus pada kelompok I tidak diberi radiasi sinar gamma. Jadi, setelah masa adaptasi selama 3 hari, tikus pada kelompok I langsung dikorbankan pada hari ke-4 untuk diambil kolonny.

- b. Tikus pada kelompok II diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal. Pada hari ke-4, setelah masa adaptasi selama 3 hari, kelompok ini diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal sebesar 10 Gy. Tikus beserta kandang dan perlengkapan yang dibutuhkan dibawa menuju Instalasi Radiologi RSUD dr.Saiful Anwar Malang dengan menggunakan mobil. Sebelum diberi radiasi sinar gamma, tikus dimasukkan ke dalam alat fiksasi yang dibuat khusus oleh penulis untuk penelitian ini. Alat fiksasi terbuat dari kardus berbentuk balok yang bersekat tanpa atap, sehingga terbentuklah ruangan-ruangan dalam balok yang berukuran sesuai dengan tubuh hewan coba. Karena hanya terdapat 6 ruangan pada alat fiksasi hewan coba, maka penyinaran untuk kelompok tikus yang diradiasi sinar gamma dosis tunggal dilakukan pada 2 tahap atau secara bergantian. Setelah hewan coba dimasukkan, alat fiksasi diletakkan pada lapangan pesawat teleterapi radiasi kobalt-60 dengan jarak 80 sentimeter dari sumber radiasi. Fokus sumber radiasi disesuaikan dengan luas lapangan objek yang diradiasi. Ilustrasi pemberian radiasi dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Waktu penyinaran pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal adalah sebesar 697 detik. Setelah pemberian radiasi sinar gamma selesai dilakukan, tikus dilepaskan dari alat fiksasinya, diletakkan kembali dalam kandang, dan dikembalikan menuju Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

- c. Tikus pada kelompok III akan diberi radiasi sinar gamma dengan dosis fraksinasi. Pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-8, setelah masa adaptasi selama 3 hari, kelompok ini diberi radiasi sinar gamma dengan dosis fraksinasi/terbagi sebesar 2 Gy per hari selama 5 hari. Tikus beserta kandang dan perlengkapan yang dibutuhkan dibawa menuju Instalasi Radiologi RSUD dr.Saiful Anwar Malang dengan menggunakan mobil. Sebelum diberi radiasi sinar gamma, tikus dimasukkan ke dalam alat fiksasi yang dibuat khusus oleh penulis untuk penelitian ini. Alat fiksasi terbuat dari kardus berbentuk balok yang bersekat tanpa atap, sehingga terbentuklah ruangan-ruangan dalam balok yang berukuran sesuai dengan tubuh hewan coba. Karena hanya terdapat 6 ruangan pada alat fiksasi hewan coba, maka penyinaran untuk kelompok tikus yang diradiasi sinar gamma dosis fraksinasi dilakukan pada 2 tahap atau secara bergantian. Setelah hewan coba dimasukkan, alat fiksasi diletakkan pada lapangan pesawat teleterapi radiasi kobalt-60 dengan jarak 80 sentimeter dari sumber radiasi. Fokus sumber radiasi disesuaikan dengan luas lapangan objek yang akan diradiasi. Waktu penyinaran pertama pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 2 Gy selama 5 hari adalah sebesar 148 detik

dengan *Depth Dose (DD)* sebesar 2,5 sentimeter. Sedangkan waktu penyinaran ke-2 sampai ke-5 pada kelompok tikus yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 2 Gy selama 5 hari adalah sebesar 141 detik dengan *Depth Doses (DD)* sebesar 3 sentimeter. Setelah pemberian radiasi sinar gamma selesai dilakukan, tikus dilepaskan dari alat fiksasinya, diletakkan kembali dalam kandang, dan dikembalikan menuju Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

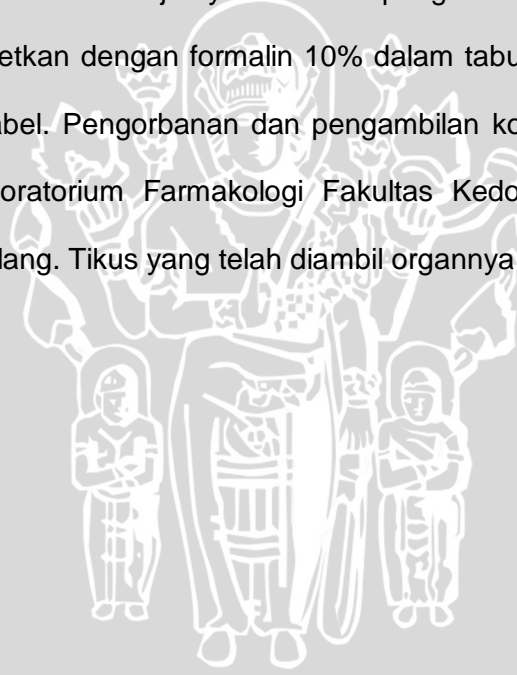
III. Sesudah Pemberian Radiasi Sinar Gamma

Perlakuan tikus setelah pemberian radiasi sinar gamma juga dibedakan berdasarkan kelompok perlakuan pemberian dosis radiasinya.

- a. Tikus yang tidak diberi radiasi sinar gamma pada kelompok I akan dikorbankan pada hari ke-4 (diberi jeda 24 jam setelah masa adaptasi selama 3 hari). Pengorbanan tikus dilakukan dengan menggunakan eter. Selanjutnya dilakukan pengambilan kolon lalu kolon tersebut diawetkan dengan formalin 10% dalam tabung spesimen yang telah diberi label. Pengorbanan dan pengambilan kolon dilakukan oleh staf ahli Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang telah diambil organnya akan dikubur.
- b. Tikus yang diradiasi sinar gamma dosis tunggal sebesar 10 Gy akan dikorbankan pada hari ke-5 (diberi jeda 24 jam setelah pemberian radiasi sinar gamma yang dilakukan pada hari ke-4). Pengorbanan tikus dilakukan dengan menggunakan eter. Selanjutnya dilakukan pengambilan kolon lalu kolon tersebut diawetkan dengan formalin 10%

dalam tabung spesimen yang telah diberi label. Pengorbanan dan pengambilan kolon dilakukan oleh staf ahli Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang telah diambil organnya akan dikubur.

- c. Tikus yang diradiasi sinar gamma dosis fraksinasi sebesar 2 Gy selama 5 hari (dosis total 10 Gy) akan dikorbankan pada hari ke-9 (diberi jeda 24 jam setelah pemberian radiasi sinar gamma yang dilakukan pada hari ke-4 hingga hari ke-8). Pengorbanan tikus dilakukan dengan menggunakan eter. Selanjutnya dilakukan pengambilan kolon lalu kolon tersebut diawetkan dengan formalin 10% dalam tabung spesimen yang telah diberi label. Pengorbanan dan pengambilan kolon dilakukan oleh staf ahli Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus yang telah diambil organnya akan dikubur.



Lampiran 4

Proses Pengerjaan Preparat Immunohistokimia

I. Proses Pemotongan Jaringan (*Gross*)

1. *Gross* hasil bedah difiksasi dengan merendamnya di dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti, kemudian dipotong dengan ketebalan kurang lebih 2-3 mm.
3. Potongan jaringan dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode *gross* peneliti
4. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses/dimasukkan ke alat *Tissue Tex Processor*
5. Diproses menggunakan alat/mesin *Tissue Tex Processor* selama 90 menit
6. Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Processor* setelah alarm tanda selesai berbunyi.

II. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan :

1. Jaringan diblok dengan parafin
2. Jaringan dipotong menggunakan alat mikrotom dengan ketebalan 3-5 mikron.
3. Potongan mikron jaringan diletakkan di atas kaca objek poly L-lisin dan masing-masing diberi label sesuai kode *gross* peneliti



III. Proses Deparafinisasi

1. Slide sediaan jaringan dipanaskan dalam oven dengan suhu 60°C selama 60 menit
2. Kemudian slide sediaan jaringan diberi larutan di bawah ini secara berurutan :
 - Xylol (2 x 10 menit)
 - Ethanol absolut (2 x 10 menit)
 - Ethanol 90% (1 x 5 menit)
 - Ethanol 80% (1 x 5 menit)
 - Ethanol 70% (1 x 5 menit)
 - Aquades steril (3 x 5 menit)

IV. Proses Retrieval Antigen dengan Sitrat Buffer

1. Rendam slide dalam wadah berisi buffer sitrat pH 6,0 kemudian dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 95°C selama 20 menit
2. Keluarkan slide dari *waterbath*, tunggu sampai suhu ruang \pm 20 menit
3. Cuci slide dengan PBS 3 x 5 menit.

V. Pewarnaan Immunohistokimia

Hari ke – 1

1. Proses *endogenous-peroxidase blocking*
 - Ditambah 3% H₂O₂ dalam methanol inkubasi 15 menit
 - Dicuci PBS steril 2 x 5 menit
2. Proses *unspecific-protein blocking*
 - Ditambah *blocking buffer/sniper* selama 60 menit pada suhu ruang

- Dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit

3. Inkubasi antibodi primer

- Ditambah antibodi primer yang dilarutkan ke dalam buffer PBS + 5% FBS (*Foetal-Bofine Serum*)
- Inkubasi selama 1 malam (\pm 18 jam) pada 4°C
- Esok harinya, keluarkan dari suhu 4°C, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit.

Hari ke – 2

1. Inkubasi antibodi sekunder

- Ditambah antibodi sekunder, inkubasi 60 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit

2. Inkubasi SA-HRP (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase*)

- Ditambah SA-HRP, diinkubasi 40 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit

3. Aplikasi kromagen DAB (*Diaminobenzidine*)

- Ditambah DAB (DAB Chromagen : DAB buffer = 1 : 50), inkubasi 10 menit pada suhu ruang
- Dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit
- Dibilas dengan *tap water* 2 x 5 menit

4. Counterstain dengan Mayer's Hematoxilen

- Ditambah Mayer : Tap water = 1 : 25, inkubasi 10 menit pada suhu ruangan
- Dicuci dengan PBS steril 2 x 5 menit
- Dibilas dengan *tap water* 2 x 5 menit

5. Mounting dengan entellan

- Biarkan slide kering pada suhu ruangan
- Setelah slide kering, siap untuk diamati di bawah mikroskop

VI. Resep larutan

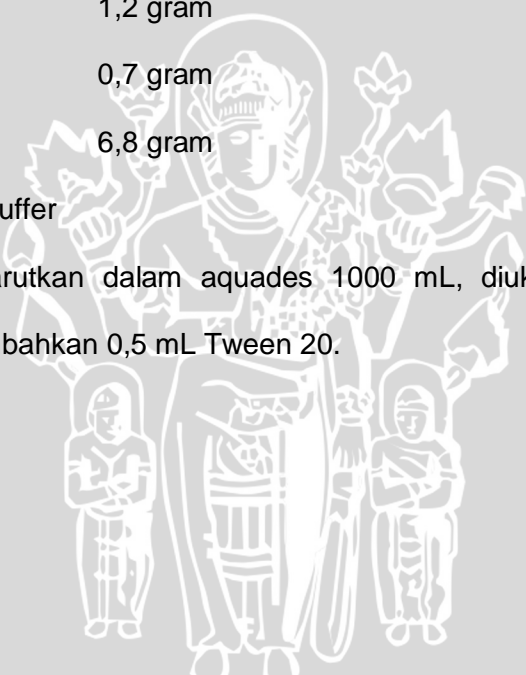
1. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

Melarutkan keempat bahan berikut dalam aquades 1000 mL, diukur pada pH 7,4.

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,4 gram
- NaH_2PO_4 1,2 gram
- KH_2PO_4 0,7 gram
- KCl 6,8 gram

2. Sodium Sitrat Buffer

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ dilarutkan dalam aquades 1000 mL, diukur pada pH 6,0 kemudian ditambahkan 0,5 mL Tween 20.



Lampiran 5

Proses Pemeriksaan dan Perhitungan Apoptosis Sel Epitel Kolon

I. Identifikasi Sel Epitel Kolon Apoptosis dengan Parameter Gambaran Caspase-3

Preparat kolon yang telah melalui proses pewarnaan immunohistokimia, diamati menggunakan mikroskop *dotSlide* dengan perbesaran total 200x. Sel yang mengalami apoptosis adalah sel yang mengekspresikan caspase-3 yang dikenali melalui gambaran warna coklat pada sitoplasma sedangkan warna biru pada nukleusnya.

Sel epitel kolon yang mengalami apoptosis selanjutnya disebut sel X dan sel epitel kolon normal disebut sel Y. Indeks apoptosis tiap sediaan jaringan diperoleh dengan menghitung persentase sel apoptosis terhadap jumlah total keseluruhan sel yang diamati, yakni 1000 sel, dimana jumlah tersebut setara dengan jumlah total sel pada 20 lapang pandang dari tiap sediaan jaringan. Selanjutnya, hasil tersebut dilakukan analisis data.

$$\text{Indeks Apoptosis} = \frac{X}{X + Y} \times 100 \%$$

II. Hasil Perhitungan Indeks Apoptosis Sel Epitel Kolon

SLIDE KOLON KONTROL

Slide	Σ Sel Apoptosis	Σ Sel Normal	Σ Sel Total	Indeks Apoptosis
Co K 1	56	944	1000	5,6
Co K 2	0	1000	1000	0
Co K 3	40	960	1000	4
Co K 4	43	957	1000	4,3
Co K 5	34	966	1000	3,4
Co K 6	36	964	1000	3,6
Co K 7	19	981	1000	1,9
Co K 8	0	1000	1000	0
Co K 9	43	957	1000	4,3

SLIDE KOLON TUNGGAL

Slide	Σ Sel Apoptosis	Σ Sel Normal	Σ Sel Total	Indeks Apoptosis
Co T 1	148	852	1000	14,8
Co T 2	124	876	1000	12,4
Co T 3	0	1000	1000	0
Co T 4	145	855	1000	14,5
Co T 5	0	1000	1000	0
Co T 6	0	1000	1000	0
Co T 7	0	1000	1000	0
Co T 8	166	834	1000	16,6
Co T 9	0	1000	1000	0

SLIDE KOLON FRAKSINASI

Slide	Σ Sel Apoptosis	Σ Sel Normal	Σ Sel Total	Indeks Apoptosis
Co F 1	282	718	1000	28,2
Co F 2	248	752	1000	24,8
Co F 3	0	1000	1000	0
Co F 4	0	1000	1000	0
Co F 5	0	1000	1000	0
Co F 6	235	765	1000	23,5
Co F 7	256	744	1000	25,6
Co F 8	0	1000	1000	0
Co F 9	0	1000	1000	0

Lampiran 6

Analisis Statistik

A. Hasil Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah Sel Kolon
N		15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	125.00
	Std. Deviation	94.310
Most Extreme Differences	Absolute	.234
	Positive	.234
	Negative	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.908
Asymp. Sig. (2-tailed)		.382

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

B. Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah Sel Kolon

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
.508	2	12	.614

C. Hasil Uji One-Way ANOVA

Descriptives

Jumlah Sel Kolon

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	7	38.71	11.221	4.241	28.34	49.09	19	56
Tunggal	4	145.75	17.212	8.606	118.36	173.14	124	166
Fraksinasi	4	255.25	19.822	9.911	223.71	286.79	235	282
Total	15	125.00	94.310	24.351	72.77	177.23	19	282

ANOVA

Jumlah Sel Kolon					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	121699.1	2	60849.536	258.666	.000
Within Groups	2822.929	12	235.244		
Total	124522.0	14			

D. Hasil Uji Post-Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel Kolon

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Tunggal	-107.036*	9.613	.000	-132.68	-81.39
	Fraksinasi	-216.536*	9.613	.000	-242.18	-190.89
Tunggal	Kontrol	107.036*	9.613	.000	81.39	132.68
	Fraksinasi	-109.500*	10.845	.000	-138.43	-80.57
Fraksinasi	Kontrol	216.536*	9.613	.000	190.89	242.18
	Tunggal	109.500*	10.845	.000	80.57	138.43

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Jumlah Sel Kolon

Tukey HSD^{a,b}

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	7	38.71		
Tunggal	4		145.75	
Fraksinasi	4			255.25
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.667.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



Means Plots

