

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksperimental *Post Test Only, Control Group Design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji dan kulit anggur (*Vitis vinifera*) dalam mengurangi volume infark otak tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi stroke iskemik. Penelitian ini menggunakan randomisasi untuk pemilihan sampel. Metode yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) karena hewan coba, tempat percobaan, serta bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Setelah 14 hari, jumlah volume infark dari tiap kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan berbagai dosis, dievaluasi untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji dan kulit anggur dalam mengurangi volume infark pada tikus model yang diinduksi stroke iskemik.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

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

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:

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

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

$$4n \geq 15$$

$$n \geq 3,75$$

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:

Kelompok	Keterangan	Jumlah Tikus
Kontrol Negatif (N)	Tidak diberi perlakuan	4
Kontrol Positif (K)	Induksi stroke tanpa diberi ekstrak biji dan kulit anggur	4
Kelompok 1	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 50mg/kgBB	4
Kelompok 2	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 100mg/kgBB	4
Kelompok 3	Induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur 200mg/kgBB	4

4.2.3 Kriteria Sampel

Sampel penelitian ini terdiri dari 30 tikus percobaan yang diambil secara *random sampling* dengan kriteria inklusi, kriteria eksklusi dan kriteria *drop out* sebagai berikut:

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jenis *Rattus norvegicus Wistar*
- Tikus berjenis kelamin jantan
- Umur 8-10 minggu
- Berat badan rata-rata 150 gram
- 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 berlangsung

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus dinyatakan *drop out* apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (independen)

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

4.3.2 Variabel Tergantung (dependen)

- Volume Infark secara makroskopis dengan metode Hematoksilin Eosin

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 *rotatory evaporator*, 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 Occlusion Carotid Artery Internal dan External*: 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 tex prosesor*, *microtome*.
- Alat pengecatan dan penghitungan volume infark: kaca benda, gelas ukur, spatula, oven, *deckglass*
- Penghitungan volume infark: menggunakan program *CellSens® Digital Imaging*
- Alat pengambilan darah tikus melalui ekor: alat pengambilan darah, spuit 1 cc, 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 Oclusion Carotid Artery Internal dan External*: 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 specimen untuk menghitung 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 volume infark adalah dengan menghitung luas daerah yang berwarna merah muda pucat pada pewarnaan Hemaktosilin dan Eosin dengan menggunakan program *CellSens® Digital Imaging*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Dimulai dengan persiapan alat dan bahan penelitian 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 didalam 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 didalam alat yang bernama *rotary evaporator* hingga air tidak lagi menetes. Hasil ekstraksi tersebut dipanaskan kembali di dalam oven dengan suhu 60°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 diteteskan 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 kedalam *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 kemudian diberi dextrose 10% dengan menggunakan sonde
8. Pada hari berikutnya darah tikus diambil melalui ekor untuk dicek kadar marker MMP-9 yang bertujuan untuk membuktikan tikus tersebut mengalami stroke iskemik

4.7.9 Pemberian Ekstrak

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

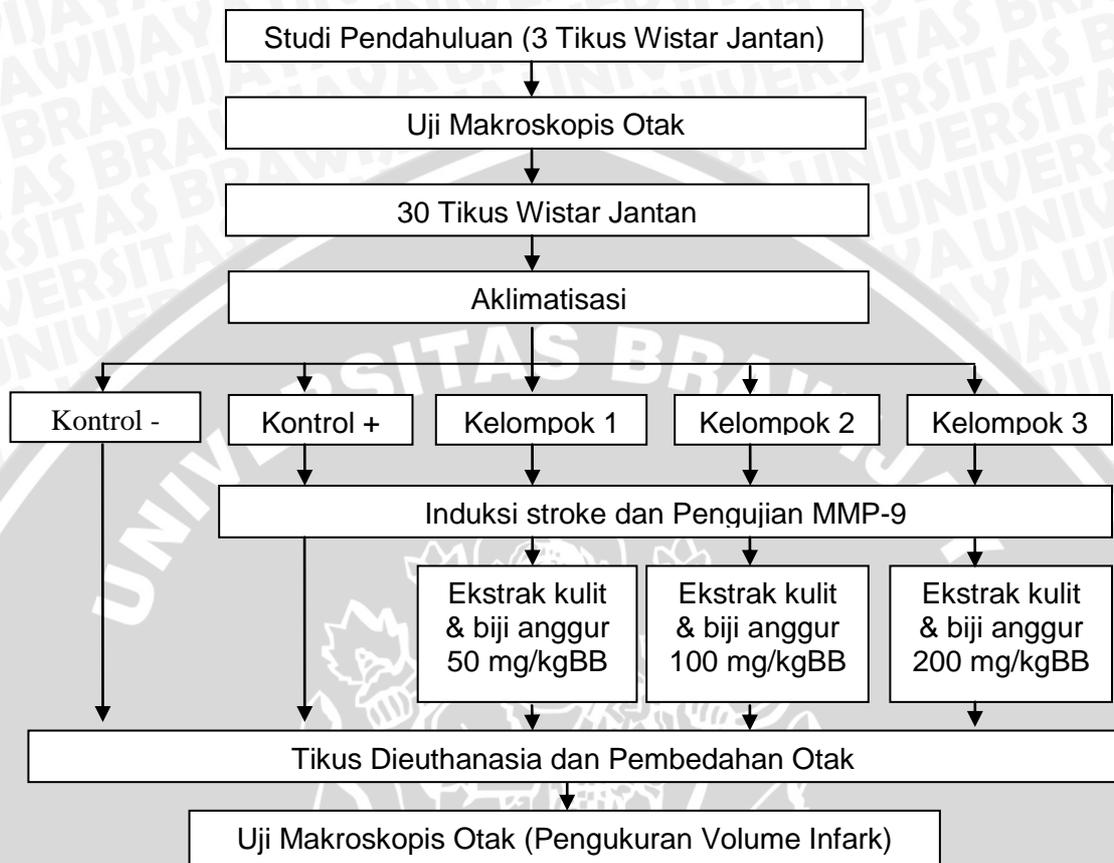
4.7.10 Pengambilan sampel

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 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 program *CellSens® Digital Imaging*. Potongan pertama dihitung mulai dari kiasma optikus dan jarak antar potongan adalah $10\mu\text{m}$.

4.7.12 Alur Penelitian



4.8 Uji Analisis Data

Data yang diambil berupa biomarker MMP-9 dan pengamatan jaringan histoPA untuk melihat infark volume. Data MMP9 diambil dari serum darah tikus 1 hari setelah penginduksian stroke iskemik dan jaringan histoPA diambil setelah pemberian ekstrak biji dan kulit anggur selama 14 hari. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap

kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$. Uji statistik dicek dengan SPSS 22.

