

Lampiran 1

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anggadha Yuniarko Saputra

NIM : 105070103111002

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku 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, 30 Januari 2014

Yang membuat pernyataan,

Anggadha Yuniarko Saputra

NIM. 105070103111002

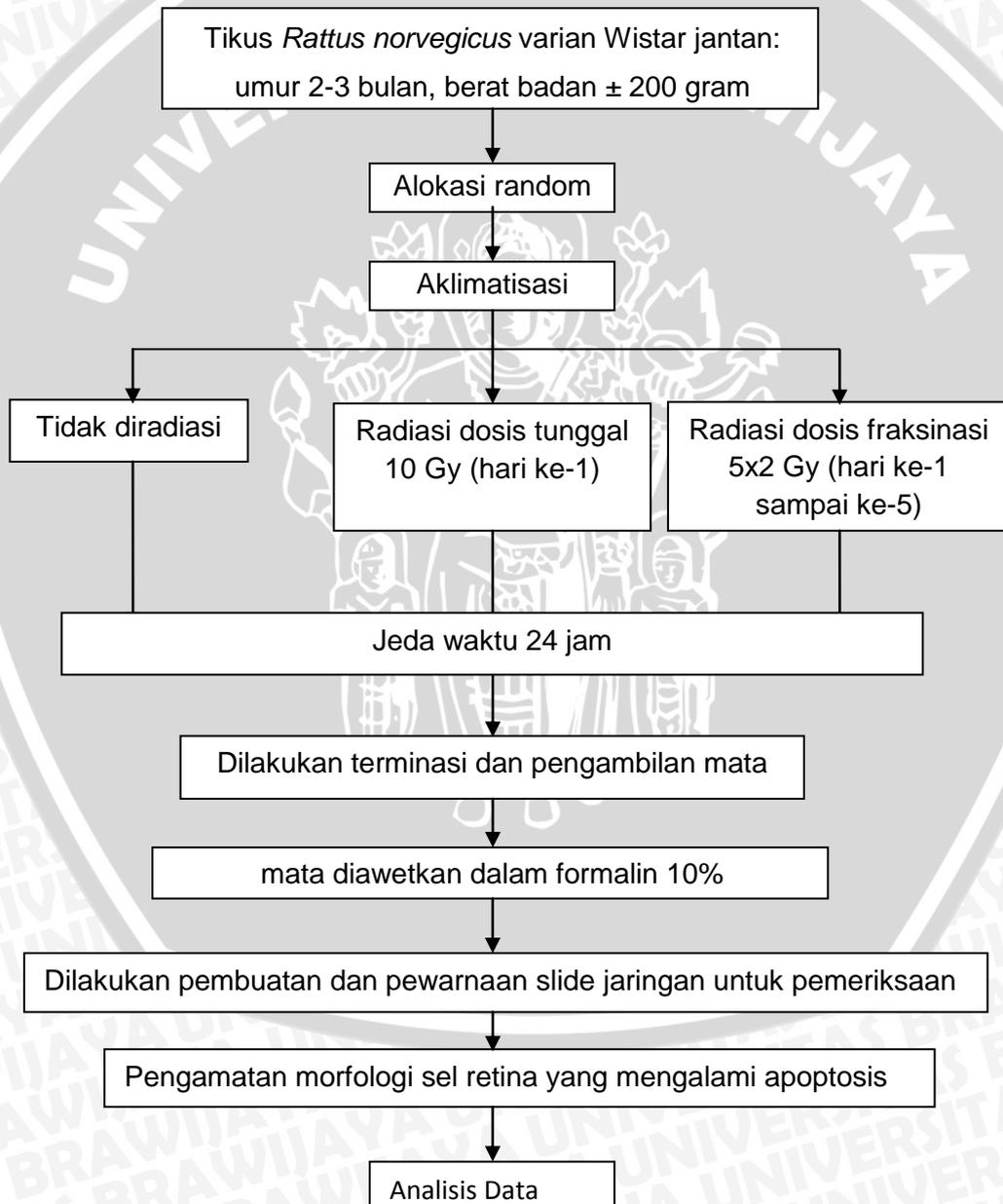
Lampiran 2



Lampiran 3

METODE PERLAKUAN, PEMBEDAHAN, DAN PENGAMBILAN ORGAN
PADA HEWAN COBA

I. Metode Perlakuan pada Hewan Coba



II. Proses Radiasi Sinar Gamma

Sebelum dilakukan penyinaran, tikus ditempatkan pada alat fiksasi. Alat fiksasi: kardus persegi panjang tanpa atap panjang 15 cm, lebar 15 cm, dan tinggi 25 cm. Disekat menjadi 6 ruangan, masing-masing ruang 7,5 x 5 cm.



Alat Fiksasi Hewan Coba



Proses Radiasi Sinar Gamma

Alat: Cobalt-60

Jarak radisi terhadap tikus: 80 cm

Lapang penyinaran: 15 x 15 cm

Dosis: a. Tunggal = 10 Gy (Untuk kelompok II)

b. Fraksinasi = 2 Gy setiap hari selama 5 Hari (Untuk kelompok III)

Waktu radiasi: a. Kelompok II = 697 detik

b. Kelompok III = Hari 1=148 detik (Depth Dose 2,5 cm)

Hari 2-5=141 detik (Depth Dose 3 cm)

Tempat: Instalasi Radiologi Rumah Sakit Saiful Anwar Malang

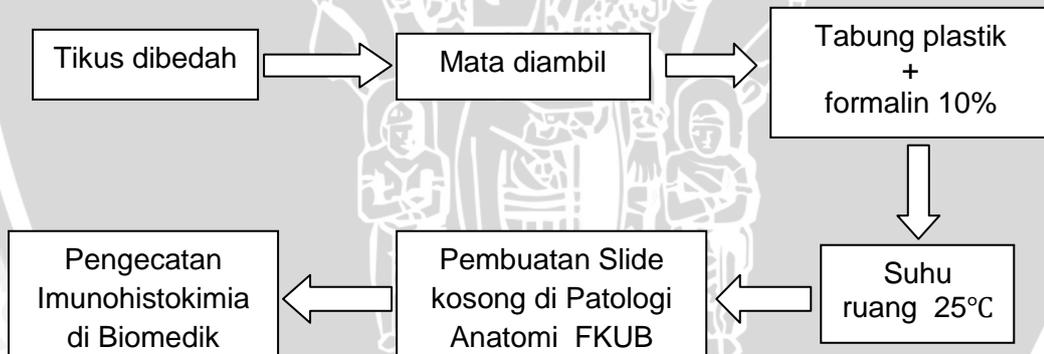
III. Terminasi

Cara: Hewan coba dimasukkan toples berisi eter selama 5 menit pada 24 jam pasca penyinaran.



Terminasi pada Hewan Coba

IV. Pembedahan, Pengambilan, dan Penyimpanan Organ Hewan Coba





Pembedahan Hewan Coba



Wadah Penyimpanan Organ



Proses Pembuatan Slide



Hasil Slide Kosong



Lampiran 4

PEMBUATAN DAN PENGECATAN PREPARAT

I. Proses Pemotongan Jaringan secara Makros

1. *Gross* hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) selama semalam.
2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti.
3. Jaringan dipotong dengan ketebalan kurang lebih 2-3 mm.
4. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode *gross* peneliti.
5. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses ke dalam alat *Tissue Tex Prosesor*.
6. Diproses menggunakan alat *Tissue Tex Prosesor* selama 90 menit.
7. Alarm bunyi tanda selesai.

II. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*.
2. Jaringan diblok dengan parafin sesuai dengan kode jaringan.
3. Jaringan dipotong menggunakan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron.

III. Proses Deparafinisasi

Setelah di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, jaringan diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C, kemudian



dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam 4 tabung alkohol (alkohol absolut, alkohol 90%, alkohol 80%, dan alkohol 70%) masing-masing selama 3 menit (hidrasi), dan yang terakhir dibilas dengan air mengalir selama 15 menit.

IV. Pengecatan Slide Kosong Jaringan dengan Teknik Imunohistokimia Menggunakan Antibodi Caspase-3

1. Pada hari pertama, dilakukan proses *antigen retrieval* terlebih dahulu dengan menggunakan *buffer* sitrat:
 - a. Slide direndam dalam *chamber* plastik yang berisi *buffer* sitrat dengan pH 6,0.
 - b. Kemudian, *chamber* dipanaskan dalam *microwave* suhu tertinggi selama 20 menit.
 - c. Slide dikeluarkan dari *chamber* dan ditunggu sampai suhunya menurun sesuai dengan suhu ruang selama kurang lebih 20 menit.
 - d. Slide dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit). (*untuk menjaga pH*)
2. Setelah proses *antigen retrieval*, dilakukan proses *blocking* enzim endogen (agar tidak false positif):
 - a. Ditambahkan 3% H₂O₂ dalam methanol dan diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruang.
 - b. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).

3. Selanjutnya, dilakukan proses *blocking* protein yang tidak spesifik:
 - a. Ditambahkan 0,25% Triton dalam *buffer* PBS dan 5% *fetal bovine serum* (FBS) selama 60 menit pada suhu ruang.
 - b. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).
4. Kemudian, dilakukan proses inkubasi antibodi primer (antibodi caspase-3):
 - a. Ditambahkan antibodi primer yang dilarutkan dalam *buffer* PBS dan 5% FBS.
 - b. Inkubasi dilakukan selama kurang lebih 18 jam (*overnight*) pada suhu 4°C.
 - c. Keesokan harinya (hari kedua), slide dikeluarkan dari suhu 4°C dan ditunggu sampai suhu slide mencapai suhu ruang.
 - d. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).
5. Setelah proses inkubasi antibodi primer, dilakukan proses inkubasi antibodi sekunder:
 - a. Ditambahkan antibodi sekunder pada slide, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang.
 - b. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).

6. Setelah itu, dilakukan proses inkubasi *streptavidin horseradish peroxidase* (SA-HRP):
 - a. Ditambahkan SA-HRP pada slide, kemudian diinkubasi selama 40 menit pada suhu ruang.
 - b. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).
7. Selanjutnya, dilakukan aplikasi *chromagen diaminobenzidine* (DAB):
 - a. Ditambahkan DAB yang merupakan kombinasi DAB *chromagen* dan DAB *buffer* dengan perbandingan 1:50.
 - b. Inkubasi dilakukan selama 10-20 menit pada suhu ruang.
 - c. Slide dicuci dengan PBS steril dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).
 - d. Slide dicuci dengan aquades dan ditunggu selama 5 menit. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak 3 kali (3 x 5 menit).
8. Berikutnya, dilakukan proses *counterstain* menggunakan Mayer's Hematoxilen (mewarnai inti untuk menunjukkan itu adalah sel):
 - a. Ditambahkan Mayer dan air ledeng dengan perbandingan 1:10, kemudian inkubasi dilakukan selama 5-10 menit pada suhu ruang.
 - b. Slide dibilas dengan air ledeng.
9. Akhirnya dilakukan proses *mounting* menggunakan entellan pada slide yang sudah tercat.
10. Slide dikeringkan secara alami menggunakan angin.

Lampiran 5

HASIL TES NORMALITAS DATA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Apoptosis Retina Tikus
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	57.33
	Std. Deviation	28.255
Most Extreme Differences	Absolute	.119
	Positive	.119
	Negative	-.111
Kolmogorov-Smirnov Z		.581
Asymp. Sig. (2-tailed)		.888

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



Lampiran 6

HASIL ANALISIS ONE-WAY ANOVA

Descriptives

Apoptosis Retina Tikus

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	8	24.75	6.497	2.297	19.32	30.18	16	35
Dosis Tunggal	8	88.50	12.224	4.322	78.28	98.72	71	105
Dosis Fraksinasi	8	58.75	10.278	3.634	50.16	67.34	43	73
Total	24	57.33	28.255	5.767	45.40	69.26	16	105

Test of Homogeneity of Variances

Apoptosis Retina Tikus

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
.956	2	21	.401

ANOVA

Apoptosis Retina Tikus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16280.333	2	8140.167	82.145	.000
Within Groups	2081.000	21	99.095		
Total	18361.333	23			

Lampiran 7

HASIL ANALISIS TUKEY DALAM POST-HOC TEST

Apoptosis Retina Tikus

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Kontrol	8	24.75		
Dosis Fraksinasi	8		58.75	
Dosis Tunggal	8			88.50
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis Retina Tikus

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Dosis Tunggal	-63.750*	4.977	.000	-76.30	-51.20
	Dosis Fraksinasi	-34.000*	4.977	.000	-46.55	-21.45
Dosis Tunggal	Kontrol	63.750*	4.977	.000	51.20	76.30
	Dosis Fraksinasi	29.750*	4.977	.000	17.20	42.30
Dosis Fraksinasi	Kontrol	34.000*	4.977	.000	21.45	46.55
	Dosis Tunggal	-29.750*	4.977	.000	-42.30	-17.20

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

