

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah model tikus wistar yang diinduksi stroke iskemik dan kemudian diberikan perlakuan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Andayani, 2003). $p(n-1) > 15$: jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan. Pada penelitian ini $p = 5$ sehingga jumlah pengulangan adalah : $5(n-1) \cdot 15$, $n-1 > 15:5$, $n \cdot 4$ jadi dalam penelitian ini jumlah sampel tiap perlakuan adalah 5.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah induksi stroke iskemik dan pemberian *fucoidan* yang dibagi dalam kelompok:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus tidak diinduksi stroke iskemik dan tidak diberikan terapi)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus diinduksi stroke iskemik tapi tidak diberikan terapi)

3. Kelompok 3: tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi ekstrak murni *fucoïdan* 50 mg/kgbb
4. Kelompok 4: tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi ekstrak murni *fucoïdan* 100 mg/kgbb
5. Kelompok 5: tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi ekstrak murni *fucoïdan* 200 mg/kgbb

Variabel tergantung penelitian ini adalah fungsi otak, lesi infark pada jaringan otak, sel *gamitocyte astrocyte* jaringan otak, ekspresi CXCR-4, aktivasi AP-1.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan pada bulan februari hingga mei 2016 di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratoirum Radiologi Rumah Sakit Saiful Anwar Kota Malang, serta Batu Materia Medica (BMM).

4.5 Bahan dan Alat / Instrumen Penelitian

1. Perawatan tikus

Alat dan bahan: Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm 25 buah, tutup kandang terbuat dari kawat 25 buah, botol air 25 buah, sekam 6 karung, timbangan berat badan dengan neraca Sartorius, dan makanan dengan pelet.

2. Induksi Stroke Iskemik

Alat dan bahan: Benang, pisau bedah, jarum bedah, *handscoon*, kapas, alkohol, sterfoam, *betadine*.

3. Pemberian terapi *fucoïdan*

Alat dan bahan: Tabung gelas 500 ml, stirer, tabung erlenmeyer, *whatman filter papers* (90mm GF/D), *aluminium foil*, larutan MeOH-CHCl₃-H₂O (4:2:1), bubuk *sargassum* 25 g, *aquades*, *ultrasonic extraction*, *waterbath*, neraca analitik, serat nylon, larutan 0,03 m HCL, *refrigerator* 4°C, larutan CaCl₂, *centrifuge* 8500 rpm 4°C, *tube centrifuge* corong, dan etanol absolut.

4. Pengukuran fungsi otak dengan *Ladder Rung Test*

Alat dan bahan: 1 set permainan anak tangga dan 1 buah video recorder.

5. Pembedahan Tikus

Alat dan bahan: Gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2, sterofoam 2, kapas, klorofom 20 ml, alkohol, wadah plastik+tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml.

6. Pengukuran ekspresi CXCR-4 dan EGFR pada jaringan otak tikus dengan imunohistokimia

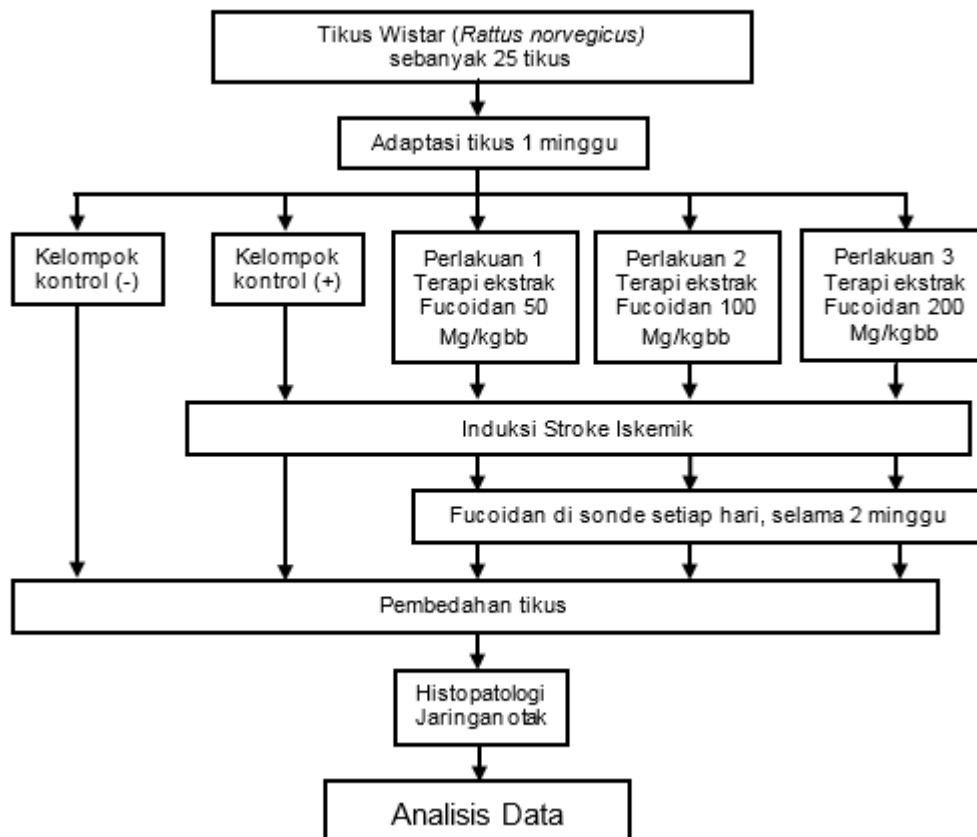
Alat dan bahan: Coating-antigen object glass, cover glass, mikrotom, mikropipet, mikroskop, PBS, H₂O₂ 3% triton x-100 0,25%, BSA, antibodi primer p85, antibodi sekunder, substrat DAB, SAHRP, entellan, meyer, *aquades*.

4.6 Definisi Istilah / Operasional

1. Hewan coba: hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus novvergicus*) jantan berusia 6-8 minggu sebanyak 25 ekor yang dibeli dari laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. *Fuoidan*: hasil ekstraksi *fuoidan* dari rumput laut coklat (*Sargassum sp.*) dengan metode metode maserasi lalu didegradasi menggunakan *ultrasonic extraction*, kemudian dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) pada suhu 4°C (Sugiyono, 2014).

4.7 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data



Gambar 4.1 Bagan Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi *fuoidan* dari *Sargassum sp.*

Alga (*Sargassum sp.*) bubuk dicampur dengan larutan MeOH-CHCl₃-H₂O (4:2:1). Alga dilarutkan dengan 0,03 M HCL (1:20 w/v) kemudian didegradasi menggunakan *ultrasonic extraction* (amplitudo 80%, 15 menit). Larutan kemudian diekstraksi menggunakan *waterbath* pada suhu 70-90°C

selama 3-5 jam. Suspensi yang dihasilkan difiltrasi menggunakan serat nylon untuk memisahkan residual alga. Ekstrak kemudian dipresipitasi menggunakan CaCl_2 pada suhu 4°C semalaman. Larutan difiltrasi kemudian dicampurkan dengan etanol absolut (3 volume) pada suhu 4°C selama 8 jam. Ekstrak kemudian dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) pada suhu 4°C (Sugiono, 2014)

2. Induksi Stroke Iskemik

Induksi dilakukan dengan metode *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) yang dilakukan dengan cara memotong bulu tikus pada bagian kepala, lalu insersi kulit sampai sutura terlihat. Buka batok kepala dan cari *middle artery cerebral*. Ikat dengan benang selama 90 menit. Buka ikatan lalu jahit. Beri betadine sebagai antiseptik (Roof, 2001).

3. Pemberian terapi ekstrak murni *fucoïdan*

Injeksi terapi dilakukan secara oral menggunakan spuit 1 cc setiap hari selama 2 minggu. Alga coklat (*Sargassum sp.*) dicuci dengan air bersih, lalu dikeringkan. Alga digiling lalu dicampur dengan larutan $\text{MeOH-CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ (4:2:1). Alga dilarutkan dengan 0.03 M HCl (1:20 w/v) kemudian didegradasi dengan *ultrasonic extraction* (amplitudo 80%, 15 menit). Larutan diekstraksi dengan *waterbath* pada suhu $70\pm 0.5^\circ\text{C}$ selama 3-5 jam, lalu difiltrasi dengan serat nylon untuk memisahkan residual alga. Ekstrak dipresipitasi menggunakan 1M CaCl_2 pada suhu 4°C semalaman. Larutan difiltrasi kemudian dicampur dengan etanol absolut (3 volume) suhu 4°C selama 8 jam. Lalu dilakukan sentrifugasi (8500 rpm, 15 menit) suhu 4°C (Sugiyono, 2014).

4. Pengukuran fungsi otak tikus

Fungsi otak tikus diukur setiap minggu dengan *Ladder Rung Test*. Susunan anak tangga yang teratur berinterval 2cm, sedangkan susunan tidak teratur berinterval 1-5cm. Terdapat 3 penilaian pada *Ladder Rung Test* yaitu berdasarkan arah gerak tikus (digolongkan apakah arahnya lurus atau berbalik), berdasarkan waktu yang ditempuh tikus, dan berdasarkan *foot fault scoring*. Ketiga penilaian tersebut dianalisis dengan menggunakan Kruskal-Wallis (Metz, 2009).

5. Pemeriksaan CT Scan

Tikus diberi Ketamin 0,4 cc dan difiksasi dengan selotip pada posisi pronasi di meja scanner. Mengisi data kelompok tikus yang diujikan dan mengambil gambar dari berbagai posisi dengan pengaturan komputer.

6. Pembedahan Tikus

Tikus diberi anestesi klorofom di dalam wadah tertutup. Tikus difiksasi di atas sterofoam lalu bedah pada daerah cervical. Potong bagian jaringan otak untuk mengambil sampel pemeriksaan imunohistokimia CXCR-4 dan AP-1, serta histopatologis jaringan dengan pengecatan hematoxilin eosin (HE).

7. Pengukuran ekspresi CXCR-4 dan AP-1 pada jaringan otak dengan menggunakan imunohistokimia

Slide dicuci dengan PBS 3x5 menit, dikeringkan, ditetesi H₂O₂ 3%, diinkubasi 15 menit, lalu bloking triton x-100 (0,25%). Inkubasi selama 1 jam, dicuci dengan PBS, dan dikeringkan. Bloking antibodi primer dilanjutkan dengan inkubasi dengan suhu 40C. Dilakukan bloking antibodi

sekunder, cuci PBS selama 15 menit, ditambahkan antibodi sekunder biotin 100 $\mu\text{L}/\text{slide}$. Setelah itu dicuci selama 15 menit, dikeringkan, lalu diberi cover. Selanjutnya pembacaan hasil pada mikroskop.

8. Slide Histopatologi Jaringan Otak dengan Hematoksin Eosin

Pembuatan preparat histopatologi dengan metode paraffin. Fiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam, dimasukkan dalam alkohol 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 99 % selama 1 jam dan alcohol absolut selama 2x1 jam, campuran xylol : alkohol absolut = 1:1 selama 0,5 jam, dan xylol PA selama 2x30 menit. Jaringan dipotong tipis dan dimasukkan kedalam *melted* paraffin : xylene = 1:1 selama 1 jam, paraffin (54-58) selama 2x1 jam, dan dimasukkan ke dalam cetakan kemudian dibiarkan dingin. Jaringan dipotong lalu dilapisi dengan lapisan putih telur:gliserol=1:1 dan dikeringkan. Jaringan dimasukkan ke dalam xylol selama 3x5 menit lalu dikeringkan. Selanjutnya pembacaan hasil pada mikroskop.

4.8 Analisis Data

Pengambilan data dilakukan dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya. Analisis data dimulai dengan uji normalitas dan homogenitas varian. Dilakukan uji *One Way Anova* jika sebaran data normal dan diuji dengan uji Kruskal-Wallis, *Post Hoc*. Teknik pengolahan dan analisis data dilakukan dengan uji statistik yang dicek dengan SPSS 18. Dengan hasil penelitian bermakna apabila didapatkan nilai $p < 0$.