

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian mengenai “Pengaruh Pemberian Serbuk Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap Ekspresi Nrf2 pada Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*) Premenopause” dilaksanakan pada bulan Desember 2016 - Mei 2017. Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat. Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler digunakan untuk pembuatan uji parafin dan uji imunohistokimia. Selain itu, uji imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Struktur dan Perkembangan Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat kelompok perlakuan dan masing-masing tiga ulangan. Empat kelompok perlakuan yang digunakan yaitu:

1. Kontrol (D0) =Kelompok kontrol diberi air mineral dan pakan pelet.
2. Kelompok 1(D1) =Kelompok perlakuan yang diberi larutan serbuk daun kemangi dosis 0,25 g/kg berat badan tikus, minum air mineral dan pakan pelet.
3. Kelompok 2(D2) =Kelompok perlakuan yang diberi larutan serbuk daun kemangi dosis 0,5 g/kg berat badan tikus, minum air mineral dan pakan pelet.
4. Kelompok 3(D3) =Kelompok perlakuan yang diberi larutan serbuk daun kemangi dosis 1 g/kg berat badan tikus, minum air mineral dan pakan pelet.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variabel bebas dan terikat.

1. Variabel bebas : Serbuk daun kemangi dengan dosis 0,25, 0,5, dan 1 g/kg BB tikus.
2. Variabel terikat : Ekspresi Nrf2.

3.4 Komposisi dan Kandungan Pakan Tikus

Pakan tikus diperoleh dari PT. Japfa Comfeed Indonesia Tbk. dengan komposisi yang terdiri dari jagung kuning, *wheat bran*, SBM, tetes, *palm olien*, asam amino esensial, mineral esensial, premix dan vitamin. Kandungan pakan tikus yang digunakan terdiri dari 12 % air, 16 % protein kasar, 3-7 % lemak kasar, 8 % serat kasar, 10 % abu, 0,8-1 % kalsium dan antibiotik.

3.5 Pembuatan Larutan Serbuk Daun Kemangi

Serbuk daun kemangi dibuat dan diperoleh dari Materia Medica, Batu, Malang. Berdasarkan hasil determinasi, spesies daun kemangi yang digunakan yaitu *Ocimum canum* Sims. (Lampiran 1). Pembuatan larutan serbuk daun kemangi dilarutkan dengan akuades berdasarkan dosis yang digunakan. Pembuatan larutan serbuk daun kemangi pada dosis 0,25 g/kg BB tikus (D1) dilakukan dengan cara dilarutkan 0,0125 g serbuk daun kemangi dalam 1 ml akuades. Sementara itu, dosis 0,5 g/kg BB tikus (D2) dilakukan dengan dilarutkan 0,025 g serbuk daun kemangi dalam 1 ml akuades serta pada dosis 1 g/kg BB tikus (D3) dilakukan dengan dilarutkan 0,05 g serbuk daun kemangi dalam 1 ml akuades. Setelah itu, larutan serbuk daun kemangi dibuat stok setiap tiga hari sekali selama 15 hari dan disimpan dalam lemari pendingin.

3.6 Persiapan Hewan Coba

Penelitian yang berjudul “Pengaruh Serbuk Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims.) terhadap Ekspresi Nrf2 pada Ovarium Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Premenopause” menggunakan hewan coba berupa tikus galur Wistar betina berusia 11 bulan sebanyak 12 ekor dengan berat rata-rata berkisar 180-220 g yang berasal dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Tikus- tikus tersebut dibagi dalam empat kelompok (Kontrol, D1,

D2, dan D3) dengan masing-masing terdiri atas tiga ekor. Tikus diaklimatisasi selama \pm 2 minggu untuk proses adaptasi dengan lingkungannya. Tikus-tikus tersebut ditempatkan dalam kandang plastik dengan tutup yang terbuat dari kawat dan dialasi sekam. Tikus betina diberi makan dalam bentuk pelet dan minum air mineral. Lingkungan kandang tikus dibuat agar tidak lembap dan diberikan ventilasi yang cukup.

3.7 Perlakuan Hewan Coba

Langkah pertama yang dilakukan yaitu tikus dilakukan apus vagina untuk mengetahui siklus estrus tikus. Perlakuan pada tikus dimulai pada fase yang sama yaitu fase estrus berdasarkan hasil apus vagina. Tikus diberi perlakuan berupa larutan serbuk daun kemangi dengan dosis 0,25, 0,5, dan 1 g/kg BB tikus. Sebelum diberi perlakuan, tikus ditimbang berat badannya menggunakan neraca analitik untuk mengetahui volume larutan serbuk daun kemangi yang akan diberikan pada tikus. Kemudian, tikus diambil ovariumnya dengan cara pembedahan di bagian abdomen pada hari ke 16. Tikus dimatikan dengan cara dislokasi leher. Ekor tikus ditarik ke belakang dan secara bersamaan leher tikus ditahan dengan kain. Ekor tikus ditarik dengan kuat ke arah belakang bersamaan dengan leher tikus ditekan ke depan dengan tangan ketika akan dibunuh.

3.8 Pembuatan Preparat Histologi

Metode pembuatan preparat histologis berdasarkan Kiernan (1990) dengan modifikasi. Organ ovarium difiksasi dengan formalin 10 % selama 24 jam. Kemudian larutan formalin 10 % diganti dengan etanol 70 % sebanyak tiga kali. Langkah pertama yang dilakukan yaitu dehidrasi ovarium pada larutan etanol bertingkat (konsentrasi 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % dan absolut). Masing-masing konsentrasi diganti setiap 30 menit. Setelah itu, organ ovarium direndam ke dalam larutan etanol absolut:xilol (1:1), xilol I dan xilol II selama 30 menit. Proses tersebut dinamakan proses *clearing*. Larutan xilol digunakan untuk proses penjernihan, sehingga jaringan akan menjadi transparan.

Clearing dilakukan dalam larutan xilol sebanyak dua kali karena pada perendaman xilol pertama kemungkinan alkohol masih ada, sehingga dilakukan *clearing* pada xilol kedua agar alkohol benar-benar tidak ada lagi pada organ. Selanjutnya, xilol: parafin (1:1), parafin I, II, dan III mengalami proses infiltrasi selama 30 menit. Organ ovarium

ditanam dalam parafin keras hingga terbentuk blok parafin. Blok parafin berfungsi untuk memudahkan proses penyayatan dengan bantuan mikrotom. Cetakan parafin terbuat dari kertas dan disiapkan dari bahan kertas karton atau manila. Parafin yang digunakan adalah parafin yang mencair pada suhu 56–59°C, agar parafin tidak terdapat gelembung udara. Proses infiltrasi dibiarkan selama satu malam agar parafin benar-benar membeku (Kiernan,1990).

3.9 Imunohistokimia (IHK)

Metode imunohistokimia yang digunakan mengacu pada Andri (2005) dengan berbagai modifikasi. Langkah pertama yang dilakukan yaitu jaringan ovarium pada blok parafin dipotong 5 µm dengan menggunakan mikrotom untuk dijadikan pita parafin. Setelah itu, pita parafin diletakkan pada gelas objek yang sudah di-*coating* dengan gelatin. Pita parafin pada *slide glass* dikeringkan dengan oven pada suhu 37 °C selama semalam. *Slide glass* yang berisi pita parafin dalam kondisi kering dilakukan deparafinisasi jaringan dengan direndam dalam larutan xilol I dan xilol II masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya proses rehidrasi (air dimasukkan dalam jaringan) dilakukan pada *slide glass* dengan digunakan xilol:etanol (1:1), 2 x etanol 100 %, 2 x etanol 95 %, etanol 90 %, etanol 70 %, dan etanol 50 %, masing-masing selama tiga menit dan dilanjutkan dengan pencucian dengan akuades selama lima menit. Fungsi akuades adalah untuk membersihkan larutan yang menempel di *slide*.

Slide glass direndam dalam larutan H₂O₂ 3 % dalam TBS 1 x pH 7,5 (*Tris buffered saline*) selama 30 menit dan dicuci dengan TBST (*TBS-0.1 % Tween 20*) sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. Fungsi TBST adalah sebagai larutan *buffer* yang digunakan untuk mencuci nitroselulosa. Sesudah itu, *slide glass* ditetesi 1 % BSA (*Bovine Serum Albumin*) dalam TBS selama dua jam pada suhu kamar. Larutan *blocking* pada *slide glass* dihilangkan dengan ditetesi larutan TBST sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. *Slide glass* ditetesi antibodi primer yaitu antibodi poliklonal, rabbit Anti-Nrf2 sebanyak satu µL dengan BSA + TBS 1 x pada suhu 4 °C selama semalam yang dilanjutkan dengan pencucian dengan larutan TBST sebanyak dua kali masing-masing selama lima menit. *Slide glass* ditetesi antibodi sekunder (*goat anti rabbit*) selama dua jam pada ruang gelap. *Slide glass* ditetesi enzim SA-HRP (*HRP-Streptavidin Conjugate*) sebanyak 100-500 µl selama satu jam di tempat gelap yang berfungsi untuk mencapai sinyal

kuat. Langkah selanjutnya ialah pewarnaan dengan diteteskan 100-500 μ l Diaminobenzidine (DAB) selama 15 menit sebagai chromogen dan dicuci dengan akuades selama 2 x 3 menit. Bagian akhirnya *counter stain* dengan *Mayer's Haematoxilin* selama satu hingga dua menit. *Slide* dipasang dengan entelan sebagai perekat pada saat *mounting*. *Slide glass* yang telah di *mounting* jangan sampai ada *air bubbly* (gelembung udara) karena akan terjadi penghitaman pada jaringan apabila masih terdapat air (Andri, 2005).

3.10 Analisis Data

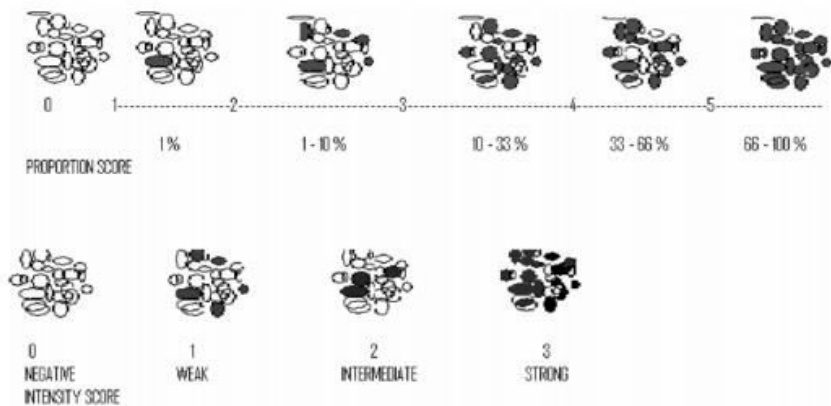
Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali sebanyak lima bidang pandang. Gambar hasil pengamatan dilakukan dengan cara dianalisis melalui *Immunoratio* website (URL: <http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>) untuk mendapatkan *Proportion Score (PS)*. *Proportion Score (PS)* adalah jumlah sel yang memiliki ekspresi positif terhadap Nrf2, yang ditunjukkan dengan adanya warna coklat. PS Nrf2 tampak berwarna coklat pada inti sel. Kemudian, Program *ImageJ* digunakan untuk mengukur *Mean Grey Value (MGV)* sehingga mendapatkan *Intensity Score (IS)*. *Intensity Score (IS)* adalah intensitas warna coklat yang mengekspresikan Nrf2 yang dinilai dengan melihat kepadatan warna pada sel (Vijayashree, 2015).

Penilaian ekspresi protein Nrf2 dinyatakan dalam bentuk *Allred Score* yang merupakan penjumlahan dari skor proporsi dan skor intensitas dengan total nilai 0 sampai 8. Hasil penjumlahan skor, apabila nilai skor 0-2 maka dianggap negatif sementara apabila skor 3-8 dianggap sebagai positif mengekspresikan Nrf2 (Qureshi & Shahid, 2010) (Tabel 1; Gambar 5). *Allred score* dianalisis dengan menggunakan ANOVA.

Tabel 1. Allred skor

Proportion Score (PS) (%)	Intensity Score (IS) dengan MGV	PS+IS
0= negatif	0=>191.5-255 = negatif	0-2 = negatif
1= <1% sel positif	1=>127.5-191.5= <i>weak</i>	3-8 = positif
2= 1-10% sel positif	2=>63.5-127.5 = <i>moderate</i>	
3= 11-33% sel positif	3=<63.5 = <i>strong</i>	
4= 34-66% sel positif		
5= 67-100% sel positif		

(Vijayashree, 2015; Qurenshi & Shahid, 2010)



(Qurenshi & Shahid, 2010)

Gambar 5. Representasi interpretasi Allred skor

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisis menggunakan SPSS versi 16 *for windows*. Selanjutnya data dianalisis dengan *one way ANOVA* dengan selang kepercayaan 95 % dan apabila signifikan maka dilanjutkan dengan uji Tukey.