

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus berupa bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm dengan penutup kandang dan botol minum, timbangan, spuit 1 cc dan 3 cc untuk injeksi ekstrak manggis dan minocycline. Peralatan bedah berupa kassa, pinset, gunting needle holder dan catgut untuk persiapan induksi TBI dan perawatan pasca induksi TBI. Silinder beban seberat 40 gram yang dijatuhkan untuk induksi TBI. Gabus dengan ukuran 20 x 20 x 2 cm dengan paper clip untuk papan bedah dan fiksasi tikus pada induksi TBI. Alat fiksator beserta selongsong berbentuk silinder berukuran tinggi 180 cm untuk induksi TBI. Peralatan pengambilan otak, plasma dan serum tikus (toples, gunting, alas, jarum pentul), peralatan untuk membuat slide preparat otak (inkubator, gelas objek, *cover glass*, mikrotom, pinset, *automatic processing*).

Peralatan yang digunakan untuk pewarnaan Hematoxylin-Eosin adalah seperangkat alat pewarna Hematoxylin-Eosin dan incubator. Peralatan yang digunakan untuk imunohistokimia adalah oven, chamber, waterbath, lemari pendingin. Peralatan yang digunakan untuk pengamatan preparat adalah mikroskop dan kamera.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan untuk induksi TBI dan perawatan pasca induksi TBI (*alcohol swab*, ketamine, xyla, alcohol 70%, betadine, novalgin dan salep gentamicin 10%), bahan untuk pengambilan otak tikus (ketamin dan formalin 10%), bahan untuk pembuatan slide preparat otak tikus (formalin 10%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, paraffin, alkohol 70%).

Bahan untuk analisis THY-1 secara imunohistokimia adalah xilol, etanol absolut, etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%, serta aquades), PBS pH 7,4, hidrogen peroksida 3%, BSA 1%, antibodi primer THY-1, antibodi sekunder berlabel biotin, SA-HRP (*StrepAvidin-Horse Radish Peroksidase*), chromogen DAB (3,3-diaminobenzedine tetrahydrochloride), Mayer Hematoxylin. Bahan yang digunakan untuk analisa histopatologi adalah xylol, etanol absolut, etanol dengan konsentrasi bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%), akuades, pewarna Hematoxylen, pewarna Eosin, dan Entellan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) terhadap Ekspresi THY-1 dan Histopatologi Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model *Traumatic Brain Injury* (TBI) dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Maret-Juni 2017.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)
2. Persiapan hewan tikus (*Rattus norvegicus*) induksi TBI (*Traumatic Brain Injury*)
3. Pemberian terapi *minocycline* dan ekstrak manggis
4. Pengambilan otak tikus
5. Pembuatan Slide Preparat Otak untuk Pewarnaan *Hematoxylen-Eosin*
6. Pembuatan Slide Preparat Otak untuk Ekspresi THY-1 secara Immunohistokimia
7. Analisis histopatologi otak tikus dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin
8. Analisis ekspresi THY-1 pada otak tikus secara Immunohistokimia
9. Prosedur analisa data

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar pada semua tikus. Kelompok 1 merupakan kelompok tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa induksi TBI dan tanpa pemberian terapi *minocycline* dan ekstrak manggis. Kelompok 2 merupakan kelompok tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus induksi TBI. Kelompok 3 merupakan kelompok tikus induksi TBI dan diterapi *minocycline* dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari. Kelompok 4 merupakan kelompok tikus induksi TBI dan diterapi ekstrak manggis dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari. Skema penelitian dapat dilihat pada **Lampiran A.1.**

Tabel 3.1. Rancangan Kelompok Perlakuan Tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Perlakuan	Ulangan				
		1	2	3	4	5
1	Kontrol negatif					
2	Kelompok positif (tikus induksi TBI)					
3	Kelompok induksi TBI dan terapi minocycline dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari selama 5 hari					
4	Kelompok induksi TBI dan terapi ekstrak manggis dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari selama 5 hari					

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan sebesar 300-350 gram. Perhitungan jumlah dari sampel dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 & (1.1) \\
 4(n-1) &\geq 15 \\
 4n-4 &\geq 15 \\
 4n &\geq 19 \\
 n &\geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5)}
 \end{aligned}$$

Keterangan:

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan estimasi dari sampel di atas, maka untuk keempat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompoknya sehingga total jumlah hewan coba tikus yang dibutuhkan sebanyak 20 ekor.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas : perlakuan penjatuhan beban pada otak, dosis terapi minocycline dan ekstrak manggis
2. Variabel terikat : organ otak, serum dan plasma darah, immunorasio ekspresi THY-1, histopatologi otak tikus
3. Variabel kontrol : jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus*.

Tikus dikandangkan sesuai dengan kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup, dimana setiap kandangnya terdiri dari 5 ekor tikus. Kandang tikus terbuat dari bak plastik dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup dari kawat.

3.4.2 Persiapan hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model TBI (*Traumatic Brain Injury*)

Model TBI pada hewan coba tikus dalam penelitian ini dilakukan dengan model penjatuhan beban Feeney. Beban dijatuhkan secara bebas dari ketinggian 180 cm di atas kepala tikus yang kulitnya terbuka. Adapun prosedur induksi TBI sebagai berikut[20]:

1. Tikus dianestesi menggunakan ketamine dengan dosis 100 mg/kgBB dan xylazine dengan dosis 10 mg/kgBB melalui injeksi intramuskular.
2. Tikus diletakkan dalam posisi telungkup pada papan bedah dan difiksasi keempat ekstremitasnya menggunakan *paper clip*.
3. Kepala tikus didesinfeksi menggunakan alkohol 70% dan rambut bagian kepala tikus dicukur.

4. Kulit kepala tikus dibuka dengan digunting dari bagian tengah diantara dua telinga ke arah frontal, hingga tampak bagian tengkorak.
5. Kepala tikus diposisikan berada tepat di bawah selongsong silinder dengan jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara.
6. Silinder besi seberat 40 g dengan diameter 4 mm dijatuhkan tegak lurus dari ketinggian 180 cm sebanyak 1 kali.
7. Kulit kepala dibersihkan, dijahit kembali, diberikan salep gentamicin 10% topical dan analgesik intramuscular.

3.4.3 Induksi *Minocycline* dan ekstrak kulit manggis

Terapi *minocycline* diberikan pada kelompok perlakuan 3 pasca induksi TBI dengan dosis 0,5 cc/hari selama 5 hari. Sedangkan terapi manggis diberikan pada kelompok perlakuan 4 dengan dosis 0,5 cc/hari selama 5 hari.

3.4.4 Pengambilan otak tikus

Pengambilan otak tikus dilakukan dengan melakukan pembedahan. Sebelum dilakukan pembedahan, tikus dieuthanasia menggunakan ketamine dengan dosis 0,2 mL. Setelah tikus tidak merespon, tikus diletakkan pada papan bedah. Selanjutnya dilakukan pemotongan leher belakang tikus atau dipotong searah punggung ke perut seluruhnya sehingga dapat terlihat batas antara tengkorak kepala dan kulit. Kulit kepala tikus di daerah lesi TBI dibuang seutuhnya. Tengkorak tikus digunting seperlunya dari arah perpotongan leher. Tengkorak dibuka dengan kekuatan jari hingga terbuka dan didapatkan penampang otak dan batas-batanya. Secara perlahan, dilakukan pemotongan saraf yang masih terhubung

ke otak. Otak dikeluarkan dengan hati-hati dan diletakkan dalam botol organ berisi larutan formalin 10%.

3.4.5 Pewarnaan preparat dengan *Hematoxyline-Eosin*

Pembuatan slide preparat otak untuk pewarnaan Hematoxylen-Eosin dilakukan dengan memotong bagian otak dengan ukuran 2 cm x 1 cm x 3 mm, kemudian dideparafinasi dengan xylol selama 5 menit sebanyak 3 kali. Lalu dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 5 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat masing-masing selama 5 menit. Setelah itu preparat direndam di dalam akuades selama 5 menit.

Langkah selanjutnya, preparat diwarnai dengan pewarna Hematoxylen selama 10 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan akuades. Berikutnya, preparat diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit lalu direndam dalam akuades. Preparat dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi bertingkat masing-masing selama 10 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian, preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 5 menit sebanyak 2 kali sebelum dikering-anginkan. Sebelum dilakukan analisa histopatologi, preparat di-*mounting* dengan Entellan dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat yang telah siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran hingga 400x.

3.4.6 Pengukuran THY-1 secara Immunohistokimia

Preparat dideparafinasi dengan xylol selama 3 kali 5 menit, dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 3 kali 5 menit. Kemudian dimasukkan dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, dan 70% serta aquades) masing-masing selama 5 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan hidrogen peroksida dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Selanjutnya ditambahkan BSA 1% (w/v) dalam larutan PBS dan diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibodi primer THY-1 dengan pengenceran 1:50 (v/v) dalam BSA 1% yang dilarutkan pada PBS (w/v) dan diinkubasi. Kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibody sekunder yang berlabel biotin dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (*StrepAvidin-Horse Radish Peroksidase*) dan diinkubasi selama 30-60 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan chromogen DAB (3,3 – *diaminobenzedine tetrahydrochloride*) dan diinkubasi selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Diberikan counterstrain (Hematoxylin) dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Dilakukan *mounting cover glass*. Selanjutnya dikeringkan hingga *entellan* kering. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan 10 kali lapang pandang kemudian data yang didapatkan diolah dengan *immunoratio*.

3.4.7 Analisis data

Analisa data kuantitatif ekspresi THY-1 otak tikus dilakukan secara statistika menggunakan uji sidik ragam *one*

way analysis of varians (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi 5% menggunakan Microsoft Office Excel dan statistical package for the social science (SPSS) version 16.0 for windows.