

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian berupa penjatuhan beban pada jaringan otak tikus model cedera otak traumatik sesuai dengan Marmarou *et al* (2007), selanjutnya dilakukan pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  dan sel apoptosis pada jaringan serta status fungsional tikus model cedera otak traumatik.

#### 4.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian sebenarnya (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

#### 4.3. Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah tikus yang dipilih memenuhi kriteria berikut:

1. Kriteria Inklusi

Tikus putih *Rattus norvegicus* galur wistar.

a. Jantan

b. Usia 10-12 minggu, karena pada penelitian ini kami menggunakan tikus dewasa sesuai dengan epidemiologi TBI lebih banyak terjadi pada dewasa muda.

c. Berat antara 100-150 gram

d. Dalam kondisi sehat dan aktif

2. Kriteria *drop out* adalah tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung.

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer (1963) dalam Tjokronegoro (2001):

$(t-1)(n-1) \geq 15$	t = kelompok perlakuan n = jumlah sampel tiap kelompok
----------------------	---

Banyaknya sampel pada penelitian ini adalah:

$$(10-1)(n-1) \geq 15$$

$$9(n-1) \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,6 \sim 3$$

Dari perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel sebanyak 3 ekor tikus pada tiap perlakuan tetapi peneliti menggunakan 4 ekor tikus, sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 40 tikus dengan perincian sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif, *Sham Procedure*
2. Kelompok kontrol positif, cedera otak traumatik yang tidak mendapatkan *catechins* untuk dikorbankan hari ke 3 (tiga) dan hari ke 7 (tujuh).
3. Kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 513 mg/kg/hari untuk dikorbankan hari ke 3 (tiga) dan hari ke 7 (tujuh).
4. Kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 926 mg/kg/hari untuk dikorbankan hari ke 3 (tiga) dan hari ke 7 (tujuh).

5. Kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 1113 mg/kg/hari untuk dikorbankan hari ke 3 (tiga) dan hari ke 7 (tujuh).

(Suzuki *et al.*, 2004)

#### **4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu di: Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk tempat pemeliharaan hewan coba dan pembedahan, Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya untuk tempat pembuatan slide imunohistokimia dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk tempat pengecatan imunohistokimia.

#### **4.5. Variabel Penelitian**

##### **4.5.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah terapi dengan *catechins* yang dibagi dalam kelompok:

- Kelompok A: merupakan kontrol negatif yang tidak dilakukan cedera otak traumatik dan tidak diberi *catechins*, *Sham Procedure*
- Kelompok B: merupakan kelompok kontrol positif cedera otak traumatik yang tidak mendapatkan *catechins*.
- Kelompok C: merupakan kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 513 mg/kg/hari per sonde selama 3 dan 7 hari. (Suzuki *et al.*, 2004)

- Kelompok D: merupakan kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 926 mg/kg/hari per sonde selama 3 dan 7 hari. (Suzuki *et al.*, 2004)
- Kelompok E: merupakan kelompok perlakuan cedera otak traumatik yang mendapatkan *catechins* dengan dosis 1113 mg/kg/hari per sonde selama 3 dan 7 hari. (Suzuki *et al.*, 2004)

Penelitian yang dilakukan Suzuki *et al* (2004) menunjukkan bahwa peningkatan *catechins* dalam plasma, mulai ditunjukkan pada kelompok dengan tingkat konsumsi *catechins* (50%) 0,77 gr/5 hari kemudian dosis kedua digunakan 1,39 gr/5 hari serta dosis ketiga 1.67 gr/5 hari untuk tikus ukuran 200 gr.

#### **4.5.2. Variabel Tergantung**

Variabel tergantung terdiri dari ekspresi TNF- $\alpha$  dan sel apoptosis pada jaringan otak serta status fungsional tikus model cedera otak traumatik.

#### **4.6. Definisi Operasional Variabel**

1. Model *traumatic brain injury* didefinisikan merupakan cedera otak jejas atau perlukaan jaringan otak bukan karena proses degeneratif atau bawaan lahir, melainkan akibat penjatuhan beban. Menggunakan model Marmarou *et al* (2007) dengan silinder besi seberat 45 gram (diameter 4 mm) dijatuhkan dengan sudut 90° dari ketinggian 100 cm sebanyak 1 kali. Energi benturan sebesar 0,45 joule.
2. *Catechins* yang dipakai pada penelitian ini adalah isolat bahan aktif dari ekstrak teh hijau (*Camelia sinensis*) yang didapatkan dari Laboratorium Kimia Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat.

3. Terapi *catechins* diberikan secara oral melalui sonde setiap hari selama 10 hari dengan dosis 513, 926 dan 1113 mg/kgBB dilarutkan sebanyak 3 cc / ekor.
4. Ekspresi TNF- $\alpha$  adalah pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  dari jaringan otak tikus yang mengalami TBI diukur dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi TNF- $\alpha$  (Santa Cruz) dan diamati menggunakan mikroskop binokuler merk Olympus BxS1 dengan pembesaran 400x.
5. Sel apoptosis adalah pengamatan jumlah sel apoptosis jaringan otak tikus dengan teknik DNA terfragmentasi (TUNEL) dan diamati menggunakan mikroskop binokuler merk Olympus BxS1 dengan pembesaran 400x.
6. Status fungsional tikus dinilai dengan NSS (*Neurological Severity Score*). NSS merupakan alat yang digunakan untuk mengevaluasi defisit neurologis pada tikus model cedera kepala tertutup yang menilai status fungsional motoris dan perilaku. Tikus tanpa defisit neurologis memiliki skor 0 dan makin berat defisit neurologis, skor semakin meningkat dengan skor maksimal 10. (Wu, *et al.*, 2010; Albert-Weißenberger *et al.*, 2012).

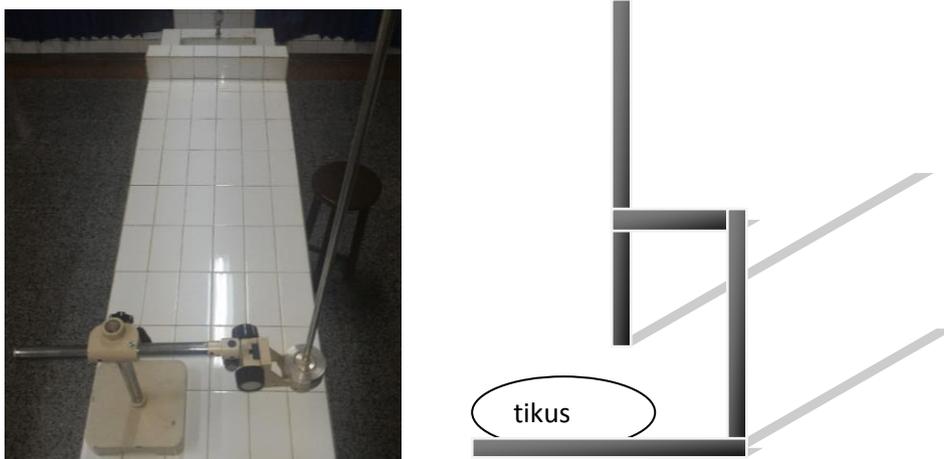
#### **4.7. Bahan dan Alat**

##### **4.7.1. Alat dan Bahan untuk Perawatan Hewan Coba**

Alat yang digunakan adalah kandang berupa baskom dengan ukuran 20x30 cm dengan penutup kandang berupa jaring – jaring kawat sebanyak 30 buah, botol minum tikus 30 buah, timbangan analitik, *handscoon* dan pembersih kandang. Bahan yang digunakan berupa sekam padi setebal 1,5-2 cm, makanan tikus terdiri dari makanan ayam jenis BR 1 lalu dicampur tepung terigu yang kemudian dibuat *pellet* dan air minum untuk tikus.

#### 4.7.2. Model Cedera Otak Traumatik

Alat yang digunakan adalah alat pengatur ketinggian beban berupa tabung dengan ketinggian 1 meter, silinder besi seberat 450 gram dengan diameter 4 mm, lampu senter, benang wol untuk mengikat ekstremitas tikus, papan untuk memfiksasi tikus, jarum pentul untuk mengaitkan benang wol, dan fiksasi kepala tikus agar penjatuhan beban tepat pada sasaran.



**Gambar 4.1** Alat untuk penjatuhan beban

#### 4.7.3. Persiapan Hewan Coba

Alat yang digunakan adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos, kapas, wadah plastik + tutup 40 buah, spuit insulin 1 ml 40 buah, dan vacuotainer 45 buah. Bahan yang digunakan adalah ketamine, xilase, 10% buffer-formalin 200 ml, salep lidocaine 5%, benang chromic catgut 3-0 dengan jarum, povidone iodine, dan alkohol.

#### 4.7.4. Pembedahan

Alat yang digunakan adalah gunting bedah 2, pinset 2, jarum pentul 2 set, steroform 2, penggaris, kertas label, termos, kapas, wadah plastik + tutup 25 buah, spuit insulin 1 ml 30 buah, dan *vacuotainer* 25 buah. Bahan yang digunakan adalah ketamine, xilase, 10% buffer-formalin 200 ml dan alkohol.

#### **4.7.5. Pembuatan *Slide* Histopatologi**

Alat yang digunakan adalah kaca obyek (*object glass*), kaca penutup (*cover glass*), *paraffin block*, rotary mikrotom merek Leica. Bahan yang digunakan adalah jaringan otak tikus wistar.

#### **4.7.6. Pembuatan Sediaan Pemeriksaan Imunohistokimia**

Alat yang dibutuhkan untuk pemeriksaan imunohistokimia antara lain *chamber* (suatu wadah dari plastik yang tahan panas), *waterbath*, *slide* mikroskop Polysine (*Polysine slide*), *timer*, mikroskop dengan pembesaran 1000x. Untuk bahan yang dibutuhkan antara lain *immunostaining kit* (Dako LSAB + *System-HRP*), antibodi primer TNF- $\alpha$ (bs-2081R Bioss USA), antibodi primer TUNEL(ba-2220R Bioss USA), *xilol*, etanol absolut, etanol 90 %, etanol 80 %, etanol 70 %, aquades steril, buffer sitrat (*Sodium Citrate Buffer* 0,01M) yang dibuat dari  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  2,94 gram yang dilarutkan dalam aquades 1000 ml dan diukur pada pH 6,0, PBS (yang dibuat dari  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,4 gram,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,2 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,7 gram, dan KCl 6,8 gram yang dilarutkan dalam aquades 1000 ml dan diukur pada pH 7,4), FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5%, Triton 0,25%, dan larutan *Mayer's Hematoxylin* dan *tap water* (air keran) dengan perbandingan 1:25 (untuk pewarnaan *background*).

#### **4.7.7. Alat Pemeriksaan Status Fungsional NSS**

Peralatan yang dibutuhkan untuk menilai status fungsional dengan NSS adalah lingkaran papan dengan berdiameter 30 cm, papan observasi berukuran 30 cm x 30 cm, forsep, balok keseimbangan berukuran 7 mm x 7 mm, tongkat silinder berdiameter 3 mm, balok jalan berukuran panjang 30 cm dan 3 variasi

lebar, 3 cm, 2 cm dan 1 cm. Gambar 4.2 a. Tikus dimasukkan ke dalam lingkaran kemudian diamati sampai tikus keluar dari pintu lingkaran, b. Balok keseimbangan dipasangkan di tongkatnya kemudian tikus diamati hingga dapat melewati balok, balok dipasang mulai dari yang paling lebar hingga yang paling sempit, c. setelah balok keseimbangan kemudian diganti dengan tongkat silinder kemudian diamati apakah tikus dapat bertahan hingga sisi seberangnya, diamati pula cara tikus bertahan dengan berpegangan pada tongkat silinder.



**Gambar 4.2 Alat pengukuran NSS**

Keterangan (gambar tampak atas) : (a) lingkaran; (b) balok keseimbangan berukuran 7 mm x 7 mm; (c) balok panjang berukuran panjang 30 cm dengan variasi lebar 1 cm (c1), 2 cm (c2), dan 3 cm (c3), (d) tongkat silinder berdiameter 3 mm.

#### **4.8. Prosedur Penelitian**

##### **4.8.1. Pemeliharaan tikus wistar**

Tikus wistar (*Rattus norvegicus* galur wistar) jantan sebanyak 20 ekor dibeli dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi FKUB. Tikus dipelihara dalam kandang ukuran 30x30 cm (satu kandang berisi 4 ekor tikus). Tikus diadaptasi selama 7 hari agar melakukan penyesuaian dengan lingkungan yang baru.

Makan dan minum diberikan dengan jumlah sesuai keinginan tikus untuk setiap kandangnya. Untuk minum diberikan air matang, yang telah direbus hingga suhu 90° C yang diganti setiap harinya. Selama pelaksanaan penelitian, tikus diperlakukan dengan hati – hati dan memperhatikan kelayakan etik penelitian dengan hewan coba.

#### **4.8.2. Pembuatan *Catechins***

Teh hijau galur GMB-4 didapatkan dari *Tea and Quinine Research Center Gambung*. *Catechins* diisolasi dari teh hijau galur GMB-4 dalam bentuk bubuk. Prosedur isolasi tersebut dilakukan pada laboratorium kimia fakultas ilmu pengetahuan, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.8.3. Model Cedera Otak Traumatik**

Cedera Otak Traumatik sesuai penelitian yang dilakukan oleh Marmarou (1994). Tikus dianestesi dengan menggunakan ketamin, kemudian bulu kepala dicukur dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya, dilakukan insisi untuk membuka kulit kepala. Silinder besi seberat 450 gram (diameter 4mm) dijatuhkan dengan sudut 90° dari ketinggian 100 cm sebanyak 1 kali. Benturan diestimasi dengan energi 0,45 joule. Setelah dilakukan prosedur, kulit kepala dijahit kembali dengan benang kromik sebanyak 3 jahitan dan dilakukan rawat luka.

#### **4.8.4. Pemberian Terapi *Catechins***

*Catechins* dilarutkan dengan pelarut aquades. Terapi *catechins* diberikan secara per oral melalui sonde setiap hari selama 7 hari dengan dosis 513, 926 dan 1113 mg/kg BB/hari. Dosis *catechins* didasarkan pada penelitian yang dilakukan Suzuki *et al* (2004) yang menunjukkan bahwa peningkatan *catechins* dalam plasma, mulai ditunjukkan pada kelompok dengan tingkat konsumsi *catechins* (50%) 0,77 gr/5

hari kemudian dosis kedua digunakan 1,39 gr/5 hari serta dosis ketiga 1.67 gr/5 hari untuk tikus ukuran 200 gr.

EGCG dan *catechins* secara umum diserap di dalam usus halus, dengan jumlah dosis minimal tertentu, seperti yang ditunjukkan pada penelitian diatas, karena sulitnya masuk *catechins* ke dalam darah. Puncak konsentrasi plasma EGCG tercapai setelah 1 hingga 2 jam pada subyek yang sehat. Kadar ini akan berkurang secara bertahap hingga benar-benar hilang dalam 24 jam. Waktu paruh EGCG sendiri berada pada sekitar  $3.4 \pm 0.3$  jam (Mereles and Hunstein, 2011).

#### **4.8.5. Pembedahan Tikus**

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan dengan injeksi ketamine 44 mg/kg BB secara intramuskular. Setelah tikus dipastikan tidak sadar (tidak menunjukkan gerakan spontan), tikus dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan otak tikus. Pembedahan tersebut dilakukan dengan cara menggunting kranium dengan arah sagital dari kaudal (oksipital) menuju ke rostral (frontal), tepat diantara kedua hemisfer otak tikus. Selanjutnya dilakukan pembebasan otak tikus pada regio basal dari jaringan ikat sekitarnya. Bagian otak yang diambil adalah lobus temporal dan prefrontal karena pada kedua lobus merupakan lobus motorik pada tikus. Selanjutnya, jaringan otak dimasukkan kedalam botol yang telah diisi larutan formalin 10%. Botol yang berisi jaringan otak dan larutan formalin tersebut selanjutnya ditutup rapat. Pengirisan jaringan otak dan pembuatan slide dengan *paraffin block* (pengirisan preparat otak dan pembuatan *slide* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr.

Soetomo). Potongan paralel dilakukan untuk analisis imunohistokimia Bcl-2 dan Bax.

#### **4.8.6. Pembuatan *Slide* Histopatologi**

Jaringan otak tikus yang telah dimasukkan dalam botol berisi formalin 10% harus segera diproses dalam waktu kurang dari 24 jam. Setelah itu jaringan otak tadi dimasukkan ke *Tissue Tex Processor* selama 90 menit. Selanjutnya, pada *Tissue Tex Processor* dilakukan proses dehidrasi dan *clearing* jaringan. Jaringan diambil dari alat tersebut dan dilakukan blok dengan menggunakan paraffin. Setelah itu, Jaringan otak yang dalam *paraffin block* tadi dilakukan pemotongan menggunakan alat *microtome* dengan ketebalan 2-3  $\mu\text{m}$ . Hasil irisan dipindahkan dengan kuas kedalam air hangat 38-40°C untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas obyek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan diatas *hot plate* 38-40°C sampai kering, selanjutnya preparat dimasukkan dalam inkubator suhu 38-40°C selama 24 jam.

#### **4.8.7. Pembuatan Sediaan Imunohistokimia**

##### **4.8.7.1. Deparafinisasi**

Sebelum dideparafinasi, *slide* dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian ditambah dengan larutan berikut ini secara berurutan: xilol (2x10 menit), etanol absolut (2x10 menit), etanol 90 % (1x5 menit), etanol 80 % (1x5 menit), etanol 70 % (1x5 menit), aquades steril (3x5 menit).

Prosedur standar fiksasi sediaan untuk pewarnaan imunohistokimia adalah menggunakan formalin yang kemudian dilakukan parafinisasi. Prosedur fiksasi

menggunakan frozen section masih berada pada tahap eksperimental, walaupun pada beberapa ekspresi protein, ditemukan hasil yang lebih baik, namun prosedur frozen section masih belum menjadi prosedur standar untuk pemeriksaan imunohistokimia secara rutin (Chaudary *et al.*, 2014)

#### **4.8.7.2. Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat**

Slide direndam dalam chamber berisi buffer sitrat pH 6,0. Chamber tersebut selanjutnya direndam dalam waterbath pada suhu 95°C selama 20 menit. Selanjutnya slide dikeluarkan dari waterbath, ditunggu sampai suhu ruang ± 20 menit. Slide kemudian dicuci dengan PBS (3x5 menit).

#### **4.8.7.3. Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi TNF- $\alpha$ Jaringan Otak**

Pada hari pertama, *slide* yang siap dilakukan pemeriksaan imunohistokimia (*immunohistochemistry/IHC*) ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol, dan diinkubasi selama 15 menit. *Slide* tersebut kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Setelah itu dilakukan proses *blocking* protein yang tidak spesifik (*unspecified protein*), yaitu *slide* ditetesi dengan 0,25% Triton dalam buffer PBS + 5% FBS selama 60 menit pada suhu ruang dan selanjutnya dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. Setelah itu dilakukan proses inkubasi antibodi primer, yaitu *slide* ditetesi dengan antibodi primer TNF- $\alpha$  yang dilarutkan dalam buffer PBS + 5% FBS, dan diinkubasikan semalam pada suhu 4°C.

Keesokan harinya, yaitu pada hari kedua, *slide* yang diinkubasikan semalam tersebut dikeluarkan dari 4°C dan ditunggu sampai suhu ruang. *Slide* tersebut kemudian dicuci dengan PBS steril 3x5 menit. *Slide* yang telah dicuci tersebut selanjutnya ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel Biotin dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasikan, *slide* tersebut dicuci PBS steril 3x5 menit. *Slide* tersebut selanjutnya ditetesi dengan

SA-HRP (Dako LSAB + *System-HRP*) dan diinkubasikan selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasikan, *slide* tersebut dicuci dengan PBS steril 3x5 menit.

*Slide* yang telah mengalami proses inkubasi dengan SA-HRP diatas selanjutnya ditetesi dengan DAB (*DAB chromogen* : *DAB buffer* = 1:50)( Dako LSAB + *System-HRP*), diinkubasikan selama 10-20 menit pada suhu ruang, dicuci dengan PBS steril 3x5 menit, dan selanjutnya dicuci dengan aquades 3x5 menit. Setelah itu, *slide* ditetesi *counterstain* dengan *Mayer's Hematoxilen*, yaitu dengan meneteskan *Mayer's Hematoxilen* : *Tap water* dengan perbandingan 1:25, diinkubasikan selama 5-10 menit pada suhu ruang, dan dibilas dengan *tap water*. Langkah terakhir dari pewarnaan imunohistokimia adalah proses *mounting* dengan Entellan, kemudian *slide* dikeringanginkan dan dilakukan pengamatan dibawah mikroskop binokuler merk Olympus BxS1 dengan pembesaran 400x. Sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  menunjukkan sitoplasma berwarna coklat. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti yang lain (2 orang) sebanyak 2 kali pemeriksaan dan juga dikonfirmasi oleh ahli patologi anatomi.

#### **4.8.7.4 Pengamatan sel apoptosis jaringan otak dengan teknik DNA terfragmentasi (TUNEL)**

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inkubasi menggunakan 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 15 menit dan selanjutnya cuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan Tunel fragmented DNA labelling selama 60 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan *peroksidase solution* selama 40 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selam 5 menit. Tetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB – DiaminoBenzidine) selama 20

menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan Counterstain dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH<sub>2</sub>O, keringkan dan tutup cover glass. Kemudian diamati dibawah mikroskop binokuler merk Olympus BxS1 dengan pembesaran 400x. Sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti yang lain (2 orang) sebanyak 2 kali pemeriksaan dan juga dikonfirmasi oleh ahli patologi anatomi.

#### 4.9 Penilaian Status Fungsional Tikus dengan NSS (*Neurological Severity Score*)

Pemeriksaan NSS dilakukan sebelum perlakuan dan setelah selesai perlakuan sebelum hewan coba dikorbankan. Penilaian NSS dijelaskan pada table 4.1 berikut,

**Tabel 4.1 Penilaian NSS**

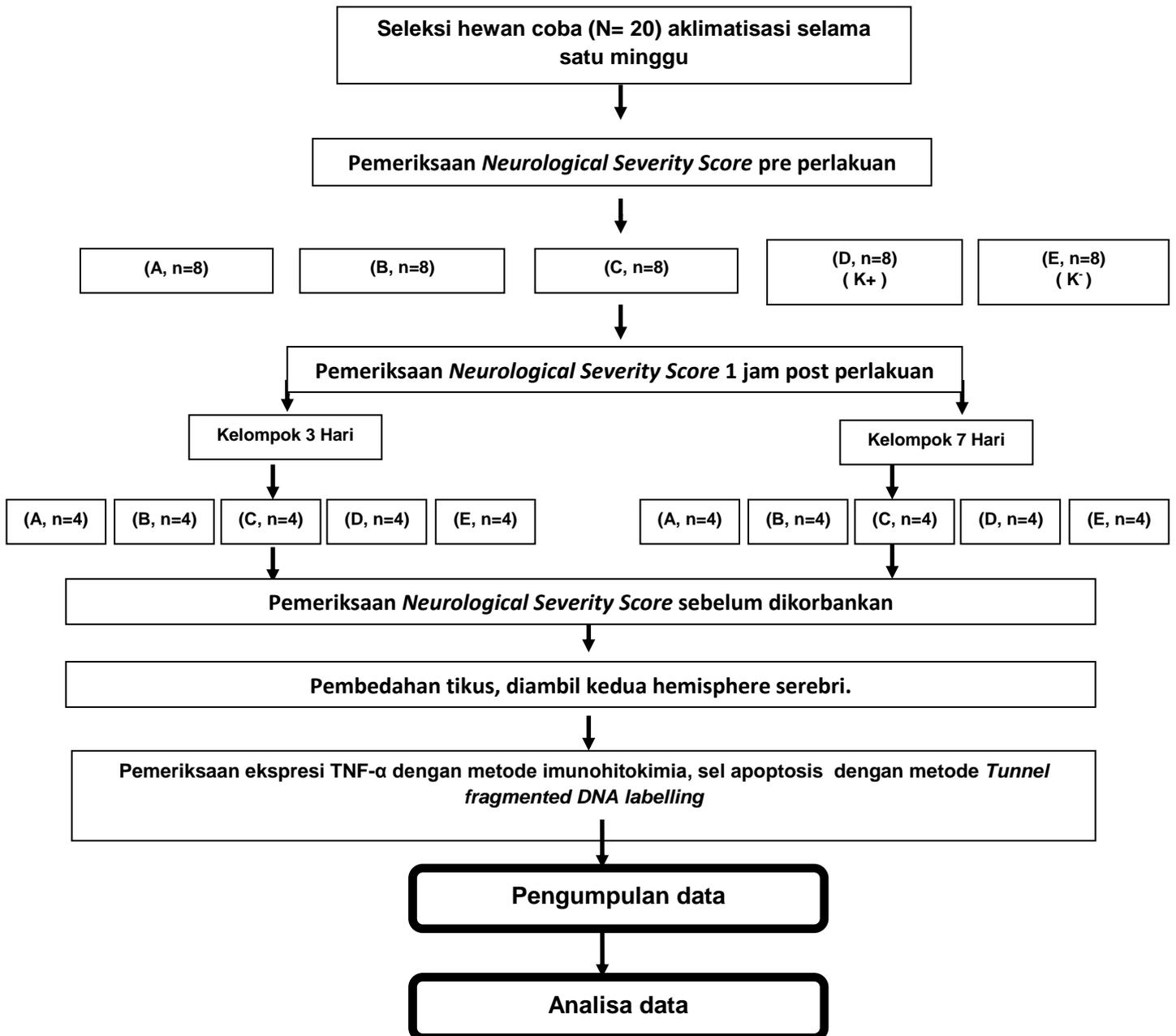
Parameter	Deskripsi	Skor
1. Keluar dari lingkaran	Tikus diletakkan pada papandan dihitung waktu keluar dari papan dengan diameter 30 cm.	0 = tikus dapat keluar dalam 2 menit 1 = tikus tidak dapat keluar dalam 2 menit
2. Perilaku mencari	Tikus diletakkan pada papan dan diamati adanya perilaku eksplorasi dan mengendus pada papan	0 = terdapat perilaku eksplorasi 1 = tidak ada perilaku eksplorasi
3. Monoparesis atau hemiparesis	Terdapat gangguan dalam menggerakkan satu (monoparesis) atau dua anggota gerak (hemiparesis). Pada normalnya, tikus dapat menggenggam forsep yang disentuhkan pada telapak anggota gerak dan memegangnya	0 = tikus dapat menggenggam forsep 1 = tikus tidak dapat menggenggam forsep
4. Berjalan lurus	Tikus diletakkan pada permukaan datar dan dinilai kesadaran, inisiasi dan kemampuan motorisnya	0 = tikus berjalan lurus 1 = tikus tidak berjalan lurus akibat kurang inisiasi atau menyeret salah satu atau lebih anggota geraknya
5. Refleks kejut	Tikus dikejutkan dengan suara tepukan, dan tampak refleks kejut dengan melompat atau gerakan menggerenyet	0 = terdapat refleks kejut 1 = tidak ada respon
6. Balok keseimbangan	Tikus diletakkan pada papan berukuran 7 mm x 7 mm dan diharapkan dapat seimbang pada papan selama 10 detik	0 = tikus dapat seimbang 1 = tikus gagal seimbang
7. Berjalan pada balok	Tes ini bertujuan untuk menilai koordinasi motorik dan keseimbangan. Terdiri	0 = tikus dapat melalui 3 balok 1 = tikus dapat melalui balok

			dari papan sepanjang 30 cm dengan lebar 3 cm, 2 cm, 1 cm	dengan lebar 3 cm dan balok 2 cm 2 = tikus dapat melalui balok dengan lebar 3 cm saja 3 = tikus tidak dapat melalui balok 0 = tikus dapat bertahan pada stik silinder seridaknya pada 2 anggota gerak 1 = tikus tidak dapat bertahan
8.	Keseimbangan tongkat silinder	pada	Menilai keseimbangan dan kekuatan genggaman dengan menggenggam stik dengan diameter 3mm	

(Wu *et al.*, 2010)

Pemeriksaan NSS dilakukan sebanyak 3 kali, yaitu pada awal akan dilakukan pemilihan tikus, karena tikus yang masuk untuk kriteria inklusi harus memiliki nilai NSS yang normal, kemudian NSS dilakukan setelah diberikan perlakuan dan kemudian NSS diperiksa sesuai hari tikus dikorbankan (untuk kelompok hari ketiga diperiksa pada hari ketiga dan untuk kelompok hari ketujuh diperiksa pada hari ketujuh).

#### 4.10 Alur penelitian



#### 4.11 Analisis Data

Data ekspresi TNF- $\alpha$ , fragmentasi DNA dan status fungsional tikus, selanjutnya diolah secara analitis dan deksripsi dengan menggunakan alat bantu *software* komputer SPSS 22.0. Analisis yang dilakukan adalah uji asumsi, normalitas dan homogenitas data. Jika uji asumsi terpenuhi, sebaran data normal

dan varian data homogen, maka untuk data TNF- $\alpha$  dan sel apoptosis digunakan uji analisis statistika parametrik, *Oneway Anova* dan *Post Hoc Tuckey*. Jika uji asumsi tidak terpenuhi, digunakan uji alternatif non parametrik *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*. Dilakukan juga uji korelasi (Korelasi Pearson untuk uji parametrik dan Korelasi Spearman untuk uji non parametrik) dan uji regresi (Regresi Theil untuk uji non parametrik dan uji regresi linier untuk uji parametrik). Sedangkan untuk data status fungsional tikus, jika uji normalitas terpenuhi, digunakan uji *Paired T-Test*, jika tidak terpenuhi maka digunakan Uji *Wilcoxon Signed Rank Test*. Penelitian ini dinilai dianalisis dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ).