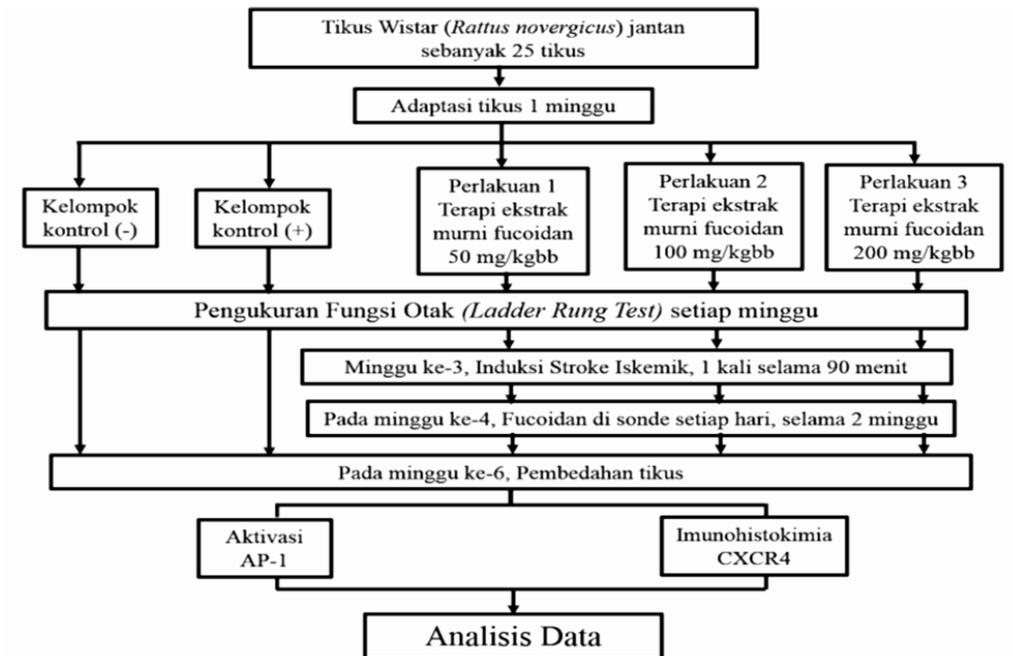


## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

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

**Gambar 4.1.** Rancangan Penelitian



### 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):

$p(n-1) > 15$  p: jumlah perlakuan, n: jumlah ulangan

Pada penelitian ini  $p = 5$  sehingga jumlah pengulangan adalah:  $5(n-1) > 15$ ,  $n-1 > 15:5$ ,  $n > 4$  sehingga dalam penelitian ini jumlah sampel perlakuan adalah 5.

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histopatologi, dan Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli hingga September 2015.

### 4.4 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 *fucoidan* 50 mg/kgbb
4. Kelompok 4: tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi ekstrak *fucoidan* 100 mg/kgbb
5. Kelompok 5: tikus diinduksi stroke iskemik dengan diberikan terapi ekstrak *fucoidan* 200 mg/kgbb

Variabel tergantung penelitian ini adalah: ekspresi CXCR-4 sebagai reseptor MSC pada jaringan otak tikus wistar model stroke iskemik.

### 4.5 Definisi Operasional

1. Fucoidan

Salah satu komponen utama dari *Sargassum sp.* adalah fucoidan yang merupakan jenis polisakarida dengan struktur utama *L-fucose* dan *sulfate ester* (Li, 2008; Meyer 2011).

1. CXCR-4 (*Chemokine Co-Receptor-4*)

CXCR-4 merupakan reseptor pada permukaan MSC (*Mesenchymal Stem Cell*) yang dapat berikatan dengan sinyal *Stromal Cell-Derived Factor 1* (SDF-1) dari area kerusakan otak untuk memicu terjadinya mobilisasi menuju area tubuh yang mengalami kerusakan sel dan jaringan (Wynn, 2004).

#### 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

##### 1. Perawatan tikus

Alat dan bahan: kandang tikus (terdiri dari 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: pisau bedah, jarum bedah (sture), jarum pentul, benang bedah, *handscoon*, kapas, alkohol, steroform, *betadine*, tali, obat bius untuk tikus.

##### 3. Pemberian terapi *fucoidan*

Alat dan bahan: Tabung gelas 500 ml, stirer, tabung erlenmeyer, *whatman filter papers* (90 mm GF/D), *alumunium foil*, larutan MeOH-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O(4:2:1), bubuk sargassum 25 g, *aquades*, *ultrasonic extraction*, *waterbath*, neraca analitik, serat nylon, larutan 0.03 m HCL, *refrigerator* 4°C, larutan CaCl<sub>2</sub>, *centrifuge* 8500 rpm 4°C, *tube centrifuge*, corong, dan etanol absolut.

##### 4. Pembedahan Tikus

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

##### 5. Pengukuran ekspresi CXCR-4 pada jaringan otak tikus dengan imunohistokimia

Alat dan bahan: Coating-antigen object glass, cover glass, mikrotom, mikropipet, mikroskop, PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, triton x-100 0,25%, BSA, antibodi primer p85, antibodi sekunder, substrat DAB, SAHRP, entellan, meyer, aquades

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 1. Induksi Stroke Iskemik

Induksi dilakukan dengan metode *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO). MCAO dilakukan dengan cara memotong bulu tikus pada bagian kepalanya, lalu diolesi alkohol. Kemudian insersi kulit bagian kepala sampai sutura terlihat. Buka batok kepala dan cari *middle artery cerebral*. Setelah menemukan, ikat menggunakan benang selama 90 menit. Setelah selesai buka ikatan. Jahit kembali kulit dengan menggunakan benang. Beri betadine yang berguna untuk antiseptik (Roof, 2001).

##### 2. Pemberian terapi ekstrak murni *fucoidan*

Injeksi terapi dilakukan secara oral menggunakan spuit 1 cc pada tikus setiap hari selama 2 minggu dimulai pada minggu ke 4. Alga coklat (*Sargassum sp.*) dicuci terlebih dahulu dengan air bersih. Alga kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Alga digiling dengan penggiling kopi agar bisa melewati saringan dengan diameter 500 µm. Alga bubuk dicampur dengan larutan MeOH-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (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 1 M CaCl<sub>2</sub> 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 (Sugiyono, 2014).

### 3. Pembedahan Tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan per inhalasi dengan kloroform dalam suatu wadah tertutup. Taruh tikus yang sudah diberi anestesi di atas sterofoam, fiksasi, lalu bedah mulai dari perut. Potong bagian otak kemudian mengambil sampel dari jaringan otot untuk pemeriksaan imunohistokimia CXCR-4 dan AP-1.

### 4. Pengukuran ekspresi CXCR-4 pada jaringan otak dengan menggunakan imunohistokimia

Slide dicuci dengan PBS selama 3x5 menit, dikeringkan dengan tisu, ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam methanol, diinkubasi selama 15 menit. Kemudian dilakukan bloking triton dengan triton x-100 (0,25%) dalam bloking buffer BSA. Kemudian diinkubasi selama 1 jam dicuci dengan PBS dan dikeringkan. Bloking antibodi primer dilanjutkan dengan inkubasi semalam dengan suhu 4°C. Untuk bloking antibodi sekunder, dengan suhu ruangan, cuci PBS selama 15 menit. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder biotin yang siap digunakan 100 µL/slide. Proses dilanjutkan dengan bloking enzim SAHRP, SAHRP diberikan 100µL/slide, diinkubasi selama 40 menit, dicuci dengan PBS selama 15 menit, dicuci dengan aquades selama 10 menit. Substrat DAB dicampurkan dengan buffer DAB dengan perbandingan 1:50, diinkubasi selama 20 menit. Meyer dicampurkan dengan air dengan perbandingan 1:10 dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu dicuci dengan air selama 15 menit, dan terakhir dikeringkan lalu diberi cover dengan entelan. Selanjutnya dilakukan pembacaan hasil pada mikroskop.

#### 4.8 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah pembedahan hari ke 42. Langkah-langkah uji hipotesis dengan menggunakan uji normalitas, homogenitas varian, *One Way ANOVA*, dan *Post Hoc Test*. Hasil penelitian dianggap bermakna apabila didapatkan nilai  $p < 0,05$ . Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 18.

#### 4.9 Jadwal Kegiatan

Tabel 4.1. Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
<b>Tahap Persiapan</b>														
1.	Mengurus <i>ethical clearance</i>	■												
2.	Mengurus perijinan laboratorium	■												
3.	Belanja alat dan bahan penelitian	■												
4.	Aklimatisasi tikus		■											
5.	Pembuatan ekstrak murni <i>fucoïdan</i>	■	■											
<b>Tahap Pelaksanaan</b>														
1.	Induksi Stroke Iskemik			■										
2.	Pemberian terapi oral <i>fucoïdan</i>				■	■								
3.	Pemeriksaan fungsi otak dengan <i>Ladder Rung Test</i>			■	■	■								
4.	Pembedahan otak tikus					■								
5.	Pengamatan ekspresi CXCR-4 dan AP-1						■	■						
<b>Tahap Penyelesaian</b>														
1.	Analisis data									■	■			
2.	Penyusunan Laporan akhir									■	■			