

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik (*true experiment*) tipe *pre* dan *post-test control group* menggunakan hewan coba mencit jantan galur *Balb/c*.

4.2 Alat Penelitian

- a. Alat-alat gelas (Pyrex)
- b. *Hot plate* 35100 (Ugo Basile)
- c. *Microsyringe* (Hamilton)
- d. Alat pemutar musik (*Media Player Classic*)
- e. *Stopwatch* (Maxpo)
- f. Jarum suntik 26G (BD Precision Glide™ Needle)
- g. Kandang mencit beserta tutupnya
- h. Mikroskop cahaya beserta kamera (Olympus)
- i. *Sound level meter*

4.3 Bahan Penelitian

- a. *Complete Freud's Adjuvant* p.a (Sigma)
- b. *Normal saline* (Bratachem)
- c. *Neutral Bufferes Formalin* p.a (Sigma)
- d. Alkohol 70 % p.a
- e. *Sinaptofisin Antibody*(Sigma)
- f. *Haematoxylin-Eosin*
- g. Eter p.a (Merck)

4.4 Subyek Penelitian

Pada penelitian ini digunakan subyek penelitian mencit jantan genus *Mus*, subfamili *Muridae*, ordo *Rodentia* spesies *Mus musculus* strain *Balb/c* berusia 2-3 bulan atau berat badan 25-30 gram, sehat dan tak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh.

Jumlah hewan coba yang digunakan tiap kelompok perlakuan ditentukan berdasarkan rumus Federer :

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

t = jumlah kelompok perlakuan (=5)

r = jumlah hewan coba tiap perlakuan

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

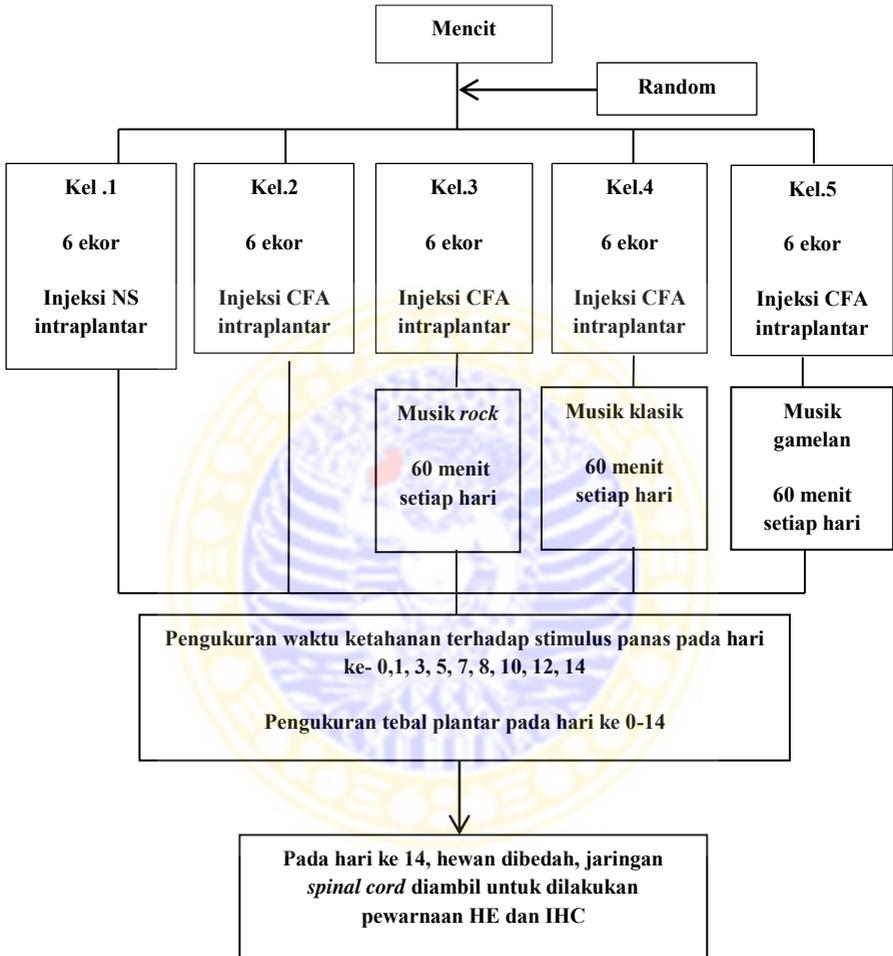
$$4(r - 1) \geq 15$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75$$

Jadi, jumlah hewan coba yang digunakan untuk tiap kelompok perlakuan dengan mempertimbangkan angka kematian sebanyak 25% adalah 7 ekor.

4.4.1 Kerangka Operasional



4.4.2 Definisi Operasional Variabel

a. Hewan coba

Pada penelitian kali ini dilakukan percobaan pada mencit (*Mus musculus*) jenis kelamin jantan, strain *Balb/c*. Pemilihan mencit sebagai hewan coba didasarkan atas kemiripan sistem fisiologis mencit dengan sistem fisiologis manusia (kemiripan struktur jaringan *spinal cord*), memiliki ukuran yang kecil sehingga penanganan dan pengendalian mencit lebih mudah dalam hal kebutuhan nutrisi dan pemeliharaan. Persyaratan mencit yang digunakan sebagai subyek dalam penelitian ini meliputi sehat, usia 2-3 bulan atau berat 25-30 gram. Definisi sehat dalam hal ini yaitu mencit tidak ada tanda kelainan atau sakit pada bagian tubuh dan harus memiliki pendengaran yang normal.

b. Musik

Musik yang diperdengarkan yaitu musik klasik gubahan Mozart (frekuensi 2000-16000 Hz; amplitudo 76-100 dB), musik gamelan jawa laras pelog (frekuensi 3500-4500 Hz), dan musik *rock* slipknot *phsycosocial* (frekuensi hingga 20000 Hz; 107-116 dB). Musik diperdengarkan pada hewan coba selama 60 menit dengan intensitas 20-25 decibels. Sumber suara diletakkan 120 cm dari kandang mencit (Rauscher *et al.*, 1998) dengan jenis musik yang berbeda pada tiap kelompok.

c. Induksi Inflamasi

Mencit diinjeksi dengan CFA karena CFA diketahui memiliki kelebihan mampu menyebabkan inflamasi pada hewan coba dengan jangka waktu panjang yaitu 21 hari dan menghasilkan model inflamasi yang menyerupai kondisi *in vivo* (Santoso, 2010). Kondisi inflamasi ditunjukkan dengan adanya peningkatan tebal plantar, tampak kemerahan, serta penurunan waktu ketahanan terhadap stimulus panas yang disertai perubahan perilaku mencit seperti mendekati kedua tungkai ke depan,

menjilat tungkai ke depan, gerakan meliuk, berusaha melompat keluar area *hot plate* dan menghentakkan tungkai ke belakang (Susilo *et al.*, 2011).

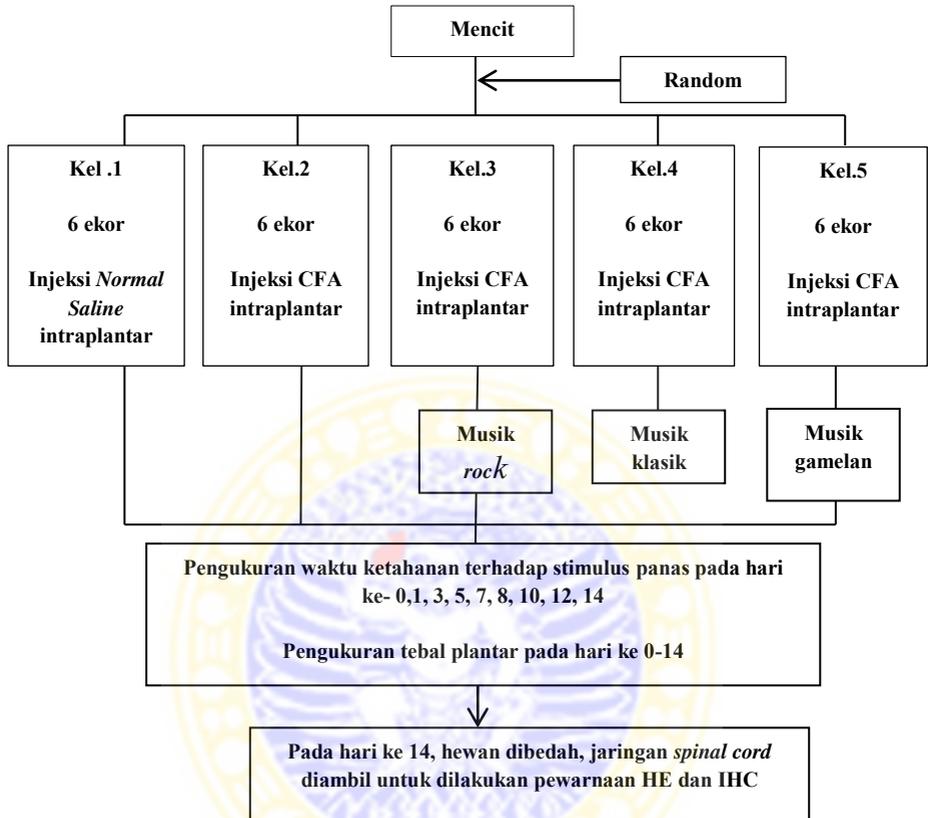
d. Pengamatan terhadap sinaptogenesis

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh musik terhadap sinaptogenesis pada *spinal cord* mencit maka dilakukan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi sinaptofisin. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop untuk dihitung berapa jumlah sel yang mengekspresikan sinaptofisin pada *spinal cord* mencit.

4.5 Protokol Penelitian

4.5.1 Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada 30 ekor mencit jantan strain *Balb/c* yang telah memenuhi syarat sebagai subyek penelitian. Mencit terbagi secara random menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. 1 kelompok sebagai kelompok kontrol diinduksi NS dan 4 kelompok diinduksi dengan CFA.



Gambar 4.1 Diagram pengelompokan hewan coba

Keterangan :

1. Kelompok kontrol (6 hewan coba)
 - Pada kelompok kontrol mencit diinjeksi intraplantar dengan larutan *Normal Saline*.
 - Dilakukan pengamatan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dengan *hot plate test* pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14.
 - Dilakukan pengamatan tebal plantar pada hari ke 0 -14.

- Pembedahan dilakukan pada hari ke 14 kemudian dilakukan pewarnaan HE dan immunohistokimia (IHC).
2. Kelompok induksi CFA(6 hewan coba)
- Kelompok induksi CFA merupakan kelompok inflamasi dimana hewan coba diinjeksi intraplantar dengan CFA.
 - Dilakukan pengamatan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dengan *hot plate test* pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14.
 - Dilakukan pengamatan terhadap tebal plantar pada hari ke 0 - 14.
 - Pembedahan dilakukan pada hari ke 14 kemudian dilakukan pewarnaan HE dan immunohistokimia (IHC).
3. Kelompok perlakuan (18 hewan coba)
- Kelompok perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok dimana masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor.
 - Mencit pada setiap kelompok diinduksi CFA melalui rute intraplantar.
 - Pada setiap kelompok diperdengarkan musik yang berbeda yaitu musik *rock*, klasik dan gamelan.
 - Dilakukan pengamatan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dengan *hot plate test* pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14.
 - Dilakukan pengamatan terhadap tebal plantar pada hari ke 0 - 14.
 - Pembedahan dilakukan pada hari ke 14 kemudian dilakukan pewarnaan HE dan immunohistokimia (IHC).

4.6 Variabel Penelitian

4.6.1 Klasifikasi Penelitian

1. Variabel bebas
 - Musik dengan frekuensi dan amplitudo yang berbeda
 - Waktu pengamatan terhadap *hot plate test*
 - Waktu pengamatan terhadap perubahan tebal plantar
2. Variabel kendali
 - Pakan dan perawatan mencit
 - Induksi CFA
 - Strain mencit, umur atau berat badan mencit, jenis kelamin mencit
3. Variabel tergantung
 - Waktu ketahanan terhadap stimulus panas
 - Perubahan tebal plantar
 - Jumlah sel yang mengekspresikan sinaptofisin pada *spinal cord*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penanganan hewan coba

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada 30 ekor mencit jantan strain *Balb/c* yang telah memenuhi syarat sebagai subyek penelitian. Mencit terbagi secara random menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor. Mencit ditempatkan dalam kandang dengan suhu ruang 24 ± 1 °C. Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah cukup. Sebelum diberi perlakuan mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama satu minggu.

4.7.2 Prosedur Kerja

A. Perlakuan musik

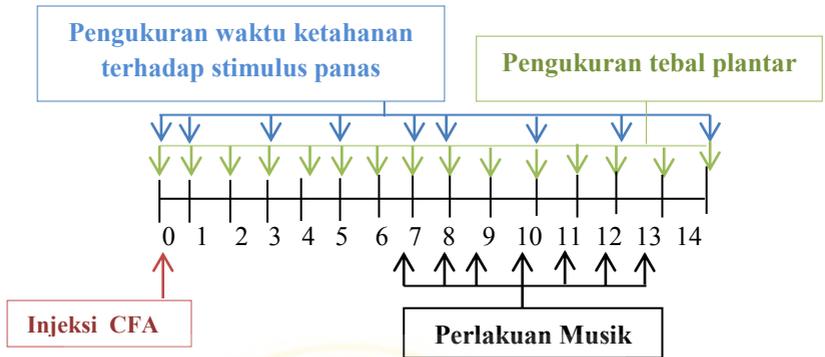
Mencit diperdengarkan musik dengan intensitas 20-25 dB. Sumber suara diletakkan 120 cm dari kandang mencit (Rauscher dalam Yuwantari, 2011).. Perlakuan ini dilakukan selama 1 jam per hari sejak hari ke-7 hingga hari ke-13.

B. Pembuatan model inflamasi

Model inflamasi dilakukan dengan injeksi intraplantar *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). Injeksi dilakukan pada daerah intraplantar tungkai kaki sebelah kanan. Jarum 26G dengan *syringe* yang telah berisi CFA disuntikkan ke dalam ruang antara kulit dan otot secara hati-hati dan perlahan. Setelah injeksi dilakukan mencit dimasukkan ke dalam kandang sesuai dengan kelompoknya.

C. Pengukuran waktu ketahanan terhadap stimulus panas

Evaluasi ini dilakukan pada *hot plate* yang diatur pada suhu $48 \pm 0,5$ °C. Apabila mencit telah diletakkan di atas *hot plate*, *stopwatch* segera diaktifkan. Ketika mencit menunjukkan respon seperti mendekatkan kedua tungkai ke depan, menjilat tungkai ke depan, gerakan meliuk, berusaha melompat keluar area *hot plate* dan menghentakkan tungkai belakang, maka *stopwatch* dihentikan dan mencit segera dikeluarkan dari *hot plate* kemudian catat waktu yang didapat. Pengujian waktu ketahanan terhadap stimulus panas dilakukan pada hari ke 0, 1,3, 5, 7, 8, 10, 12 dan 14 pada semua kelompok. Pengukuran hari ke-0 digunakan sebagai *baseline*.



Gambar 4.2 *Timeline* model inflamasi

D. Pengukuran tebal plantar

Evaluasi tebal plantar dilakukan dengan pengukuran menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada hari ke-0-14 pada seluruh kelompok. Pengukuran hari ke-0 digunakan sebagai *baseline*.

E. Preparasi imunohistokimia *spinal cord*

Metode uji imunohistokimia (IHC) yang akan digunakan adalah *Labelled Streptavidin Biotin II* (LSAB II). Mencit yang akan diambil jaringannya dimatikan dengan menggunakan eter, kemudian hewan coba dibedah untuk mengambil jaringan *spinal cord* yang kemudian difiksasi dengan *neutral buffered formalin* 10%. Dapar dalam formalin berfungsi mencegah pengasaman yang dapat menyebabkan autolisis dan presipitasi pigmen dalam jaringan. Tahap-tahap yang dilakukan adalah sebagai berikut: Tahap I (Deparafinisasi-Rehidrasi)

1. Mencilupkan preparat IHC dalam larutan *xylol* I, II, dan III masing-masing selama 5 menit

2. Rehidrasi dengan cara mencelupkan dalam larutan alkohol secara bertahap dengan konsentrasi menurun (99%, 90%, 80%, 70%) masing-masing selama 2 menit
3. Preparat dicuci dengan air selama 5 menit
4. Preparat dicuci dengan aquadest selama 5 menit

Tahap II (*Blocking Peroxidase Endogenous*)

5. Preparat dimasukkan dalam $H_2O_30,3\%$ dalam methanol (selalu baru) pada suhu kamar selama 5 menit, kemudian dibilas dengan aquadest selama 5 menit

Tahap III (*Antigen Retrieval*)

6. Menghangatkan TRS (*Target Retrieval Solution*)/Buffer Citrat dalam *container* pada *microwave* posisi “*hight*” selama 2 menit
7. Memasukkan preparat IHC dalam *Container Buffer Cytrat* yang hangat dan masukkan kembali ke *microwave* posisi “*hight*”, diamati sampai muncul “*bubble*” pertama lalu memindah posisi *microwave* “*low*” dengan rentang waktu selama 20 menit
8. Mendinginkan larutan *Buffer Citrat* pada suhu kamar selama 20 menit, kemudian cuci dengan aquadest selama 5 menit dan mengusapkan tissue sekitar area sayatan jaringan
9. Preparat dicuci dengan TRS Buffer selama 5 menit, dan mengisapkan tissue sekitar area sayatan jaringan
10. “*Marking Pen Immunologic*” disekeliling sayatan jaringan sesuai dengan kebutuhan

Tahap IV (*Blocking Background*)

11. Meneteskan Protein Block Serum Free X 0909 pada suhu kamar pada area “*Marking Pen Immunologic*” kemudian dicuci dengan

TRIS Buffer selama 5 menit dan mengisapkan tissue sekitar area sayatan jaringan

Tahap V (Pewarnaan Utama)

12. Meneteskan antibodi sinaptofisin dalam area “Marking Pen Immunologic” kemudian diinkubasi pada Magnetic Immunostaining dalam keadaan tertutup pada suhu kamar selama 1 jam atau 4°C semalam
13. Mencuci preparat dengan TRIS Buffer dengan shaker selama 5 menit dan mengisapkan tissue sekitar area “Marking Pen Immunologic”
14. Meneteskan antibodi sekunder (*Biotinlabelled link*) dalam area “Marking Pen Immunologic” pada suhu kamar selama 10 menit
15. Mencuci preparat dengan TRIS Buffer dengan shaker selama 5 menit dan mengisapkan tissue sekitar area “Marking Pen Immunologic”
16. Meneteskan HRP (*Streptavidin Peroxidase Conjugate*) dalam area “Marking Pen Immunologic” kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit
17. Mencuci preparat dengan TRIS Buffer dengan shaker selama 5 menit dan mengisapkan tissue sekitar area “Marking Pen Immunologic”
18. Meneteskan DAB dalam area “Marking Pen Immunologic” pada suhu kamar selama 5-10 menit
19. Mencuci preparat dengan air mengalir selama 5 menit

Tahap IV (*Counter Stain*)

20. Memasukkan preparat IHC ke dalam *Meyer's Haematoxyllin* pada suhu kamar selama 2 menit

21. Mencuci preparat dengan air mengalir selama 5 menit
22. Dehidrasi dilakukan dengan cara mencelupkan dalam larutan alkohol selama 2 menit
23. *Clearing* dengan cara mencelupkan preparat IHC dalam larutan *xylol* I,II,III masing-masing selama 5 menit
24. Mounting medium dengan menggunakan EZ-Mount

4.8 Analisa Data

Untuk data peningkatan tebal plantar dan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dianalisis dengan analisis statistika *one way* ANOVA. Jika dari analisis statistika dua arah ini ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) maka analisis dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *Least Significant Differences* (LSD).

Sedangkan untuk analisis immunohistokimia, dilakukan pengamatan jaringan *spinal cord* dengan menggunakan mikroskop kemudian dilakukan perhitungan terhadap jumlah sel neuron yang mengekspresikan *sinaptofisin* dengan menggunakan *cell count*. Selanjutnya dilakukan analisis dengan uji *independent t-test* dan analisis statistika satu arah (*one way* ANOVA), jika dari analisis statistika satu arah ini terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) maka analisis dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *Tukey's test*.