

**PENGARUH INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS)
TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN AKTIVITAS
ENZIM PROTEASE PADA OTAK TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

**Oleh:
TRI WIDYAWATI
0911310067**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS)
TERHADAP PROFIL PROTEIN DAN AKTIVITAS
ENZIM PROTEASE PADA OTAK TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
TRI WIDYAWATI
0911310067



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Profil Protein dan
Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**

Oleh:
TRI WIDYAWATI
0911310067

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 06 Maret 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Dyah Ayu O.A.P., M.Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tri Widyawati
NIM : 0911310067
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi yang berjudul :

Pengaruh Induksi Lipopolisakarida terhadap Profil Protein dan Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Februari 2014
Yang menyatakan,

Tri Widyawati
0911310067

Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Profil Protein dan Aktivitas Enzim Protease pada Otak Tikus (*Rattus norvegicus*)

ABSTRAK

Lipopolisakarida merupakan salah satu komponen membran bakteri Gram negatif penyebab sepsis patogenik. Efek yang diakibatkan oleh adanya paparan LPS yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif seperti *E.coli* bisa menyebabkan meningitis. Meningitis merupakan peradangan pada meninges, lapisan tipis yang mengelilingi otak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap profil protein dan aktivitas protease. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berumur \pm 3 minggu dan BB \pm 150 g yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok normal (tidak diinduksi LPS) dan kelompok diinduksi LPS. Induksi LPS dilakukan secara intrasisternal sebanyak 20 ng/ μ L. Parameter yang diamati adalah profil protein menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) sedangkan aktivitas protease diukur dengan menggunakan metode Walter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi LPS menyebabkan terbentuk pita protein dengan Berat Molekul 160,5 kDa (diduga Ig G). Induksi LPS juga meningkatkan aktivitas protease secara sangat signifikan ($p < 0,01$) sebesar 91,89%. Rata-rata aktivitas protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) normal dan kelompok perlakuan berturut-turut adalah: $0,003 \pm 0,0009 \mu\text{mol/mL.menit}$ dan $0,037 \pm 0,0045 \mu\text{mol/mL.menit}$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah induksi LPS sebesar 20 ng/ μ L secara intrasisternal dapat menyebabkan perubahan profil protein otak dan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim protease. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: LPS, otak, protease, profil protein, SDS PAGE

The Effect of Lipopolysaccharide (LPS) Induction on Protein Profile and Protease Enzyme Activity of the Rat (*Rattus norvegicus*) Brain

ABSTRACT

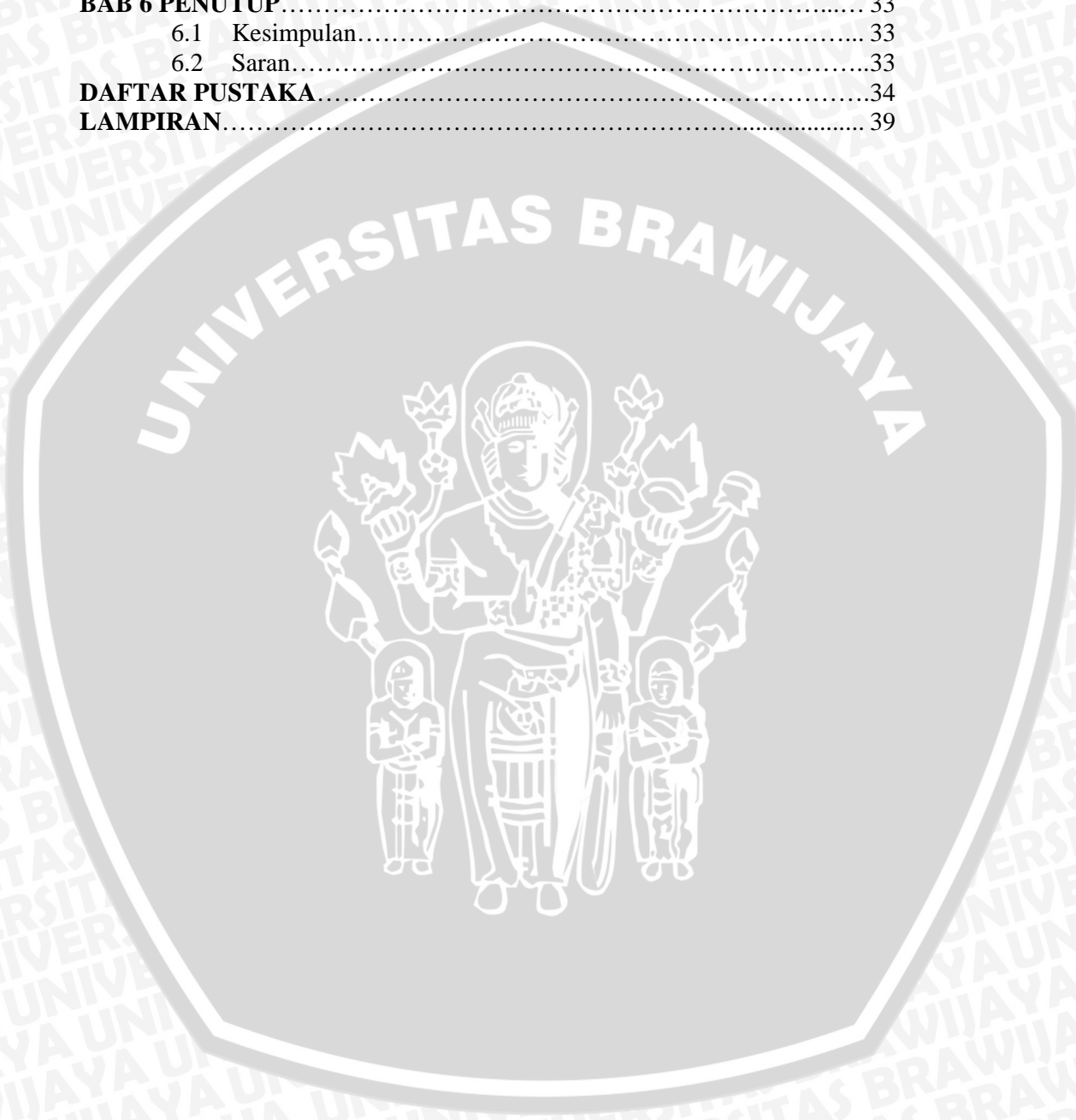
Lipopolysaccharide is one component of the Gram-negative bacteria membrane causing pathogenic sepsis. The effects which caused by exposure of LPS produced of Gram-negative bacteria (*E. coli*) can cause meningitis. Meningitis is an inflammation of the meninges, the thin layer that surrounds brain. This study aimed to determine the effect of LPS on the brain induction to the protein profile and protease activity. This study used a males rat with ± 3 weeks old and BW ± 150 g which were divided into two groups: normal (not induced by LPS) and LPS-induced group. The induction of LPS was conducted intracysternally with dose of 20 ng/ μ L. Parameter of this research were protein profile by using Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis (SDS PAGE) method and the protease activity that by using Walter's Method. The results of the research showed that LPS induction caused formation of protein band with 160.5 kDa of molecular weight (which assumed as Ig G). The induction of LPS increased protease activity significantly ($p < 0.01$) to be 91.89 %. The protease activity average of normal group and LPS-induced group respectively: 0.003 ± 0.0009 μ mol/mL.min and 0.037 ± 0.0445 μ mol/mL.min. The conclusion of the study is induction of LPS on 20 ng/ μ L intracysternally cause the change of protein profile of the brain and increase in the protease enzyme activity. It shows that there is a defect on the Rat (*Rattus norvegicus*) brain.

Keywords: LPS, brain, protease, protein profile, SDS PAGE

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Lipopolisakarida (LPS) <i>E. coli serotype</i> 026B6.....	5
2.2 Patomekanisme Induksi LPS pada Otak.....	7
2.3 Meningitis	9
2.4 Protease.....	10
2.5 Pengaruh LPS pada Otak.....	11
2.7 Hewan coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	12
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konseptual.....	14
3.2 Hipotesis Penelitian.....	16
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
4.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	17
4.2.1 Bahan Penelitian.....	17
4.2.2 Alat Penelitian.....	17
4.3 Sampel Penelitian.....	18
4.4 Rancangan Penelitian.....	18
4.5 Variabel Penelitian.....	19
4.6 Tahapan Penelitian.....	19
4.6.1 Persiapan Hewan Coba Tikus Putih.....	19
4.6.2 Injeksi LPS pada Tikus Putih.....	19
4.6.3 Pengambilan Organ Otak.....	20
4.6.4 Isolasi Protein Otak Tikus Putih.....	21
4.6.5 Penentuan Profil Protein Dengan SDS PAGE.....	21
4.6.6 Pengujian Aktivitas Protease.....	21
4.6.7 Analisis Data Statistik.....	22

BAB 5 HASIL & PEMBAHASAN.....	23
5.1 Gambaran Profil Protein Otak Tikus Putih.....	23
5.2 Aktivitas Protease Otak Tikus Putih	28
BAB 6 PENUTUP.....	33
6.1 Kesimpulan.....	33
6.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	39



KATA PENGANTAR

Puji syukur Kehadirat Tuhan Yang Maha Esa penulis haturkan karena atas berkah dan rahmatNya sehingga mampu menyelesaikan tugas sarjana yang berjudul “Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) Profil terhadap Profil Protein dan Aktivitas Enzim Protease pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)”. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian tentang meningitis yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES. Selama penyusunan tugas sarjana ini telah melibatkan banyak pihak sehingga penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES dan drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech. selaku dosen pembimbing yang telah tulus ikhlas membimbing penulis.
2. Kepada Dyah Kinasih Wuragil S.Si., M.P., M. Sc., drh. Tiara Widyaputri dan drh. Handayu Untari selaku penguji.
3. Asisten Laboratorium Biokimia FMIPA atas segala bantuan.
4. Seluruh jajaran Dekanat, Dosen dan Staf PKH UB atas motivasinya.
5. Ibu dan Bapak Kardi yang telah memberikan motivasi tiada henti dan berkorban segalanya.
6. Saudara kandung: mbak Indar, mbak Eva, dek Ayu, kembar tersayang (dek Nana dan dek Tata), serta iparku (bang Kausin dan mas Yani, keponakan lucu (mas Eza dan dek Meylani), juga keponakan angkatku dek Angga Amiluhur yang telah memberikan segenap cinta.
7. Sahabatku tercinta jeng Nick Rose yang telah mendengar segenap cerita panjangku.
8. Sahabatku kos Dahlia Tambaksari 09 A Merjosari dengan segenap motivasi yang telah diberikan kepada penulis: Isna, mbak Tri, pipi Kasih, dek Sifa (teman sekamar), mbak Ika, mbak Aisyah, dek Ami, dek Iva, mbak Iim, mbak Ratna, mbak Evi, mbak Faya, dek

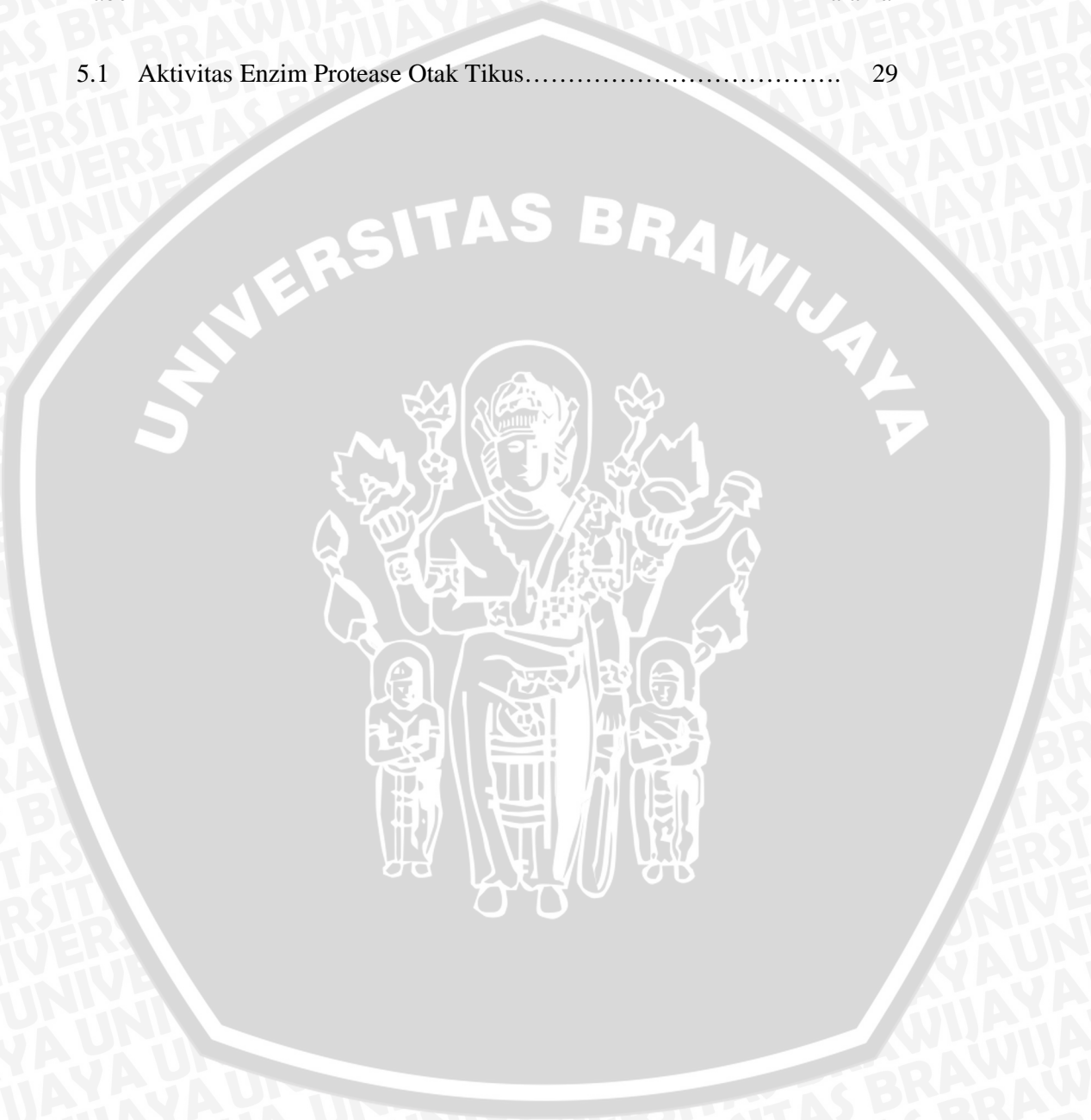
- Shinta, Dian, dek Diva, dek Nying, dek Aas, dek Faiq dan semuanya saja yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.
9. Teman seperjuangan detik-detik terakhir skripsi: Sdri. Putrika yang telah menemani dan memberikan semangat.
 10. Adik-adikku tercinta angkatan 2010-2012 yang telah memberi semangat: dek Laduni, dek Ima, dek Jannah, dek Dyah Ayu N., dek Primaden, dek Firdaus, dek Fithrotul, dek Fifin, dek Rikki, dek Ima, dek Nega, dek In, dek Firdaus, dek Shally, dek Gedhe, dek Wira, dek Yanti, dek Ratih, dek Faiz dan adik-adikku semua yang terkenang.
 11. Segenap teman-teman An-Nahl yang telah memberikan semangat.
 12. Mbak Indri di ruang baca PKH yang telah memberikan motivasi.
 13. Teman-teman sejawat Kedokteran Hewan UB angkatan 2008-2012 yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.
 14. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan tugas sarjana ini.
- Akhir kata, semoga tugas sarjana ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan bagi penulis juga pembaca.

Malang, 28 Februari 2014

Penulis

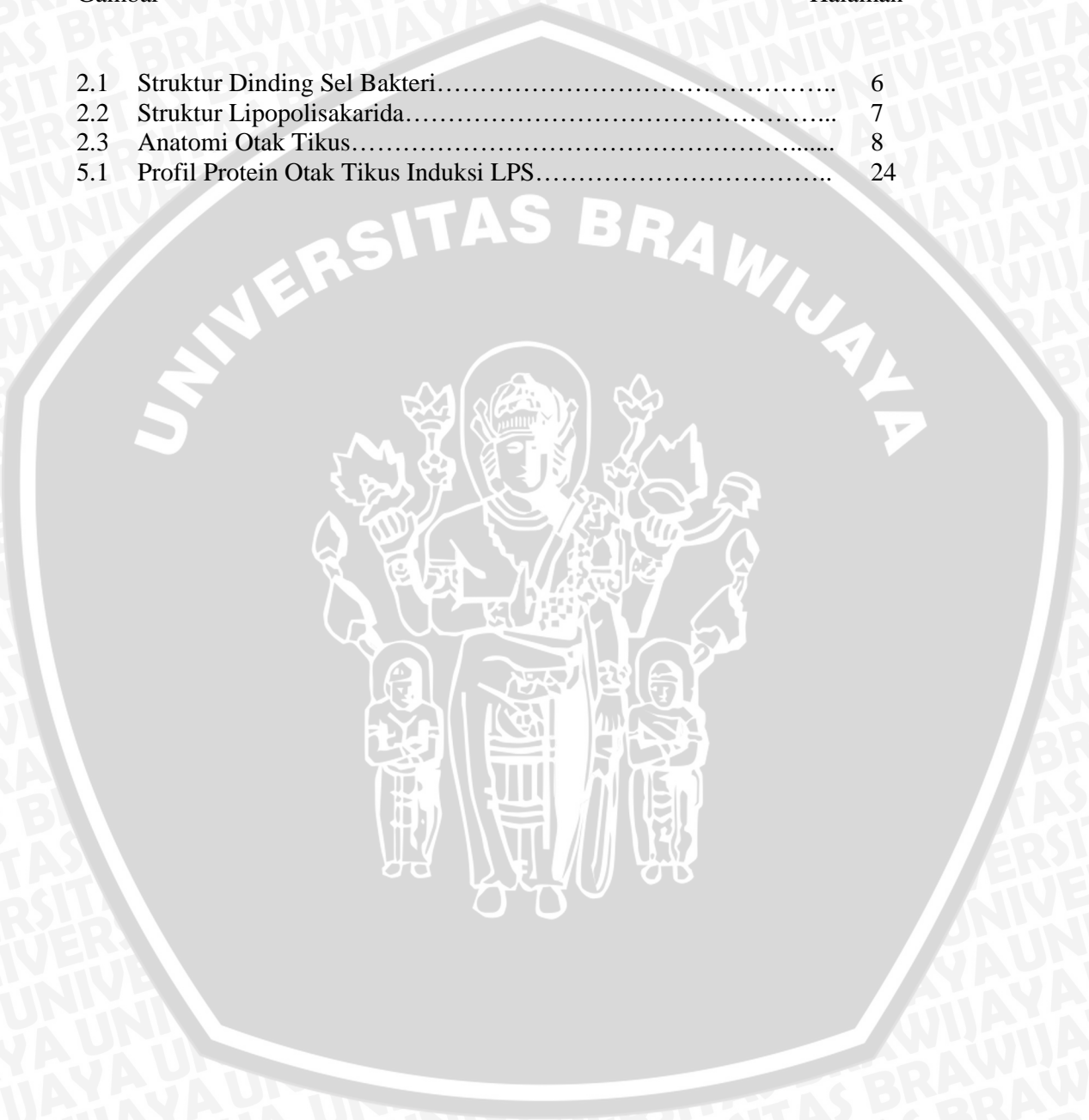
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus.....	29



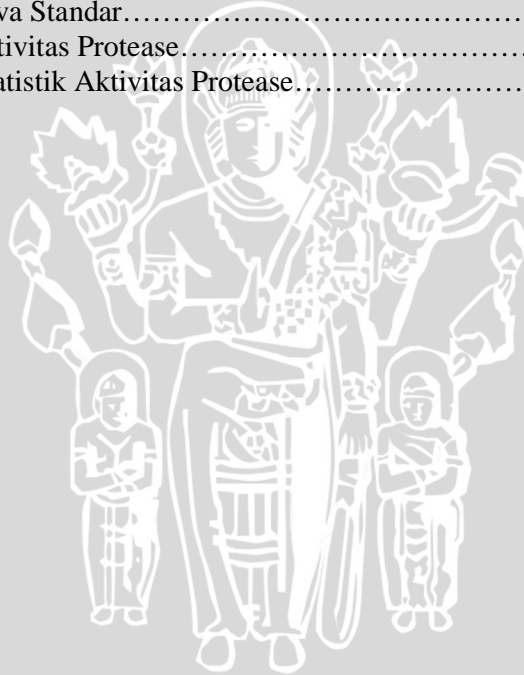
DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Struktur Dinding Sel Bakteri.....	6
2.2	Struktur Lipopolisakarida.....	7
2.3	Anatomi Otak Tikus.....	8
5.1	Profil Protein Otak Tikus Induksi LPS.....	24



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Sertifikat Laik Etik.....	39
2 Alur Penelitian.....	40
3 Larutan yang Digunakan dalam Penelitian.....	41
4 Komposisi Pakan Standar.....	43
5 Penentuan Profil Protein dengan teknik SDS PAGE.....	44
6 Langkah-langkah Uji Aktivitas Protease.....	46
7 Lokasi Injeksi Intrasissternal.....	49
8 Perhitungan Berat Molekul.....	51
9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin.....	53
10 Pembuatan Kurva Standar.....	54
11 Perhitungan Aktivitas Protease.....	55
12 Data dan Uji Statistik Aktivitas Protease.....	57



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/ Singkatan	Keterangan
APS	Amonium Persulfat
BBB	<i>Blood Brain Barrier</i>
BM	Berat Molekul
CD14	<i>Cluster of Differentiation</i>
HCl	Hidrogen Klorida
IFN γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
KDO	2-keto -3-deoxy-D-manno-2-octulosonate
KCl	Kalium Klorida
KH ₂ PO ₄	<i>Potassium dihydrogen phosphat</i>
LBP	Lipopolisakarida Binding Protein
LGB	Lower Gel Buffer
LPS	Lipopolisakarida
MMP-9	<i>Matrix Metallo Protease-9</i>
Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphate
H ₂ O	Hidrogen dioksida/Air
NaCl	Natrium Klorida
PBS azida	Phosphat Buffer Saline azida
PBST PMSF	<i>Phoshat Buffer Saline Tween Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
Rf	Retardation factor
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RSB	<i>Reducing Sample Buffer</i>
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TCA	<i>Thricloroactic Acid</i>
TEMED	<i>Tetramethyl-1,2-diamino ethane</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
Th2	<i>T-helper 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like-Receptor4</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UGB	<i>Upper Gel Buffer</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lipopolisakarida (LPS) adalah salah satu komponen membran bakteri Gram negatif yang merupakan penyebab patogenik sepsis. Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif, misalnya *Eschericia coli* (Marianingsih, 2012). Efek yang ditimbulkan oleh adanya paparan LPS yang dihasilkan oleh *E.coli* bisa menyebabkan meningitis. Meningitis merupakan inflamasi pada meninges, lapisan tipis yang mengelilingi otak yang disebabkan oleh bakteri, virus, riketsia dan protozoa (Suharsono, 2003).

Infeksi LPS menimbulkan akibat cukup signifikan yaitu kematian. Meningitis yang disebabkan oleh bakteri merupakan masalah kesehatan di seluruh dunia karena angka mortalitas dan kecacatan neurologisnya tinggi. Prevalensi kejadian meningitis di negara berkembang yaitu diestimasi lebih dari seratus kasus tiap seratus ribu penduduk (WHO, 2005). Insiden infeksi *E. coli* di Indonesia menyebabkan kematian tiga juta penduduk pada tahun 2004 (Valencia, 2013). Insiden meningitis di Indonesia pada anak di bawah lima tahun berkisar antara 65-158 per seratus ribu (Arydina, 2013). Menurut Schumacher *et al.* (2011) bahwa meningitis dapat terjadi pada kambing yang terinfeksi *Mycoplasma mycoides*. Penelitian Smith *et al.* (2004) juga menyebutkan bahwa meningitis bisa terjadi pada kuda. Meningitis juga bisa menyerang anjing, babi, dan sapi (Long, 2011).

Beberapa data penelitian terbaru menyebutkan bahwa induksi LPS menyebabkan produksi sitokin yang merupakan mediator proinflamasi pada otak tikus (Ward *et al.*, 2011). Penelitian Feng *et al.* (2008) menjelaskan bahwa LPS yang dipaparkan ke domba yang sedang bunting berefek menyebabkan kematian pada fetus domba. Kematian dari fetus disebabkan adanya LPS yang sudah menyebar secara sistemik di dalam tubuh induk. Menurut Xu (2013), menjelaskan bahwa pemberian LPS menyebabkan stres oksidatif pada otak tikus. Induksi LPS bisa menyebabkan kerusakan pada hipokampus dan berefek seperti anxietas (Wang *et al.*, 2013). Hasil penelitian Bossu *et al.* (2012) mengenai injeksi endotoksin secara intraperitonial dapat meningkatkan ekspresi TNF- α dan IL-1 β . *Tumor Necrosis Factor-alpha* menyebabkan agregasi atau perpindahan dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim proteolitik berupa enzim protease pada otak (Agustita, 2013). Oleh karena enzim adalah protein, maka pengendalian metabolik dapat diketahui dengan mendeteksi perubahan profil protein yang terjadi (Suheryanto & Elisa, 2010).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengkaji tentang pengaruh induksi LPS terhadap profil protein dan aktivitas enzim protease otak hewan model tikus. Penelitian ini menggunakan hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) karena merupakan hewan model standar yang sering digunakan dalam kajian mekanisme infeksi pada otak disebabkan paparan LPS (Willette *et al.*, 2010; Erny, 2012).

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perumusan masalah adalah:

1. Bagaimanakah pengaruh induksi LPS terhadap profil protein otak tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
2. Bagaimanakah pengaruh induksi LPS terhadap aktivitas enzim protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasar atas rumusan masalah yang sudah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan berumur 3 minggu dengan berat badan ± 150 g didapat dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba saat ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 182-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Pemberian larutan LPS *E. coli serotype* 026B6 (Sigma) diberikan pada hewan coba dengan dosis 20 ng/ μ L dengan cara injeksi intrasisternal (Agustita, 2013; Erny, 2012).
3. Pengamatan profil protein dilakukan menggunakan metode SDS PAGE.
4. Pengukuran aktivitas enzim protease menggunakan metode Walter dan konsentrasi protein diukur dengan spektrofotometer.

1.4 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap profil protein.
2. Mengetahui pengaruh induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap aktivitas enzim protease.

1.5 Manfaat

Memberikan informasi tentang pengaruh induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap profil protein dan aktivitas enzim protease.

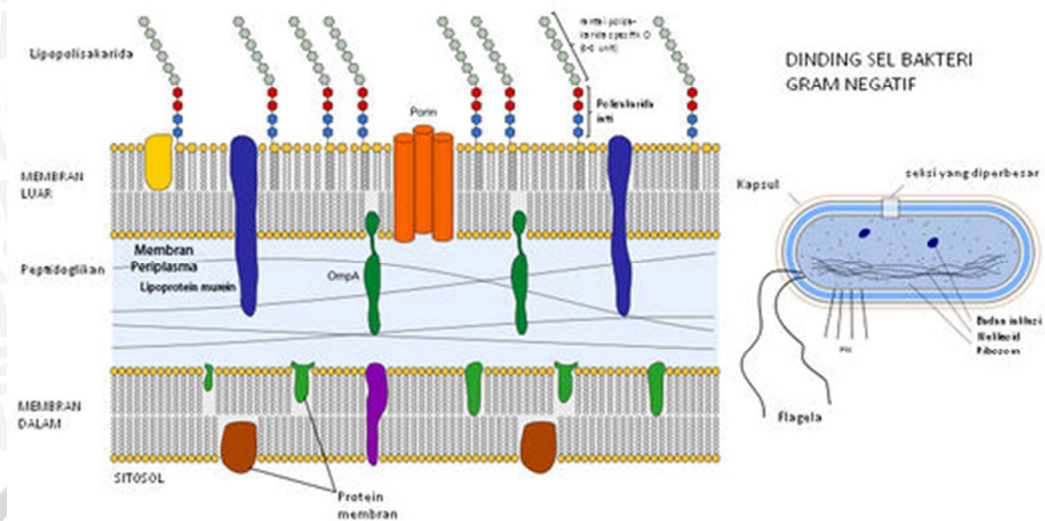


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lipopolisakarida (LPS) *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri yang terdapat pada area digesti. Karakteristik bakteri ini meliputi: bersifat Gram negatif; biasanya terdapat tunggal, berpasangan, dan dalam rantai pendek; biasanya tidak berkapsul, tidak berspora, bisa motil atau tidak motil, peritrikus, aerobik, aerobik fakultatif; dan seringkali menyebabkan infeksi (Jawetz, 2005). Bakteri *E. coli* memiliki struktur dinding sel yang terdiri atas peptidoglikan, lipid, dan protein (**Gambar 2.1**). Bakteri ini juga menghasilkan LPS yang bersifat endotoksin. Lipopolisakarida merupakan komponen besar membrane dari bakteri Gram negatif. Lipopolisakarida berada di lapisan luar dari membran, terekspos pada permukaan sel. Membran polisakarida pada bakteri Gram negatif melindungi bakteri dalam *bile salts* dan antibiotik (Wilson, 2001). Menurut Todar (2008) lipopolisakarida merupakan endotoksin yang stabil terhadap panas dan telah lama dikenali sebagai faktor penyebab septisemia melalui penginduksian respon imun yang kuat pada sel mamalia.

Lipopolisakarida terletak pada bagian terluar dari membran selubung sel bakteri Gram negatif. Lipopolisakarida berfungsi sebagai pengatur permeabilitas membran, pelindung dan penghalang impermeabel masuknya komponen berbahaya ke dalam sel dan juga berperan dalam mekanisme pertahanan bakteri (Marianingsih, 2012).



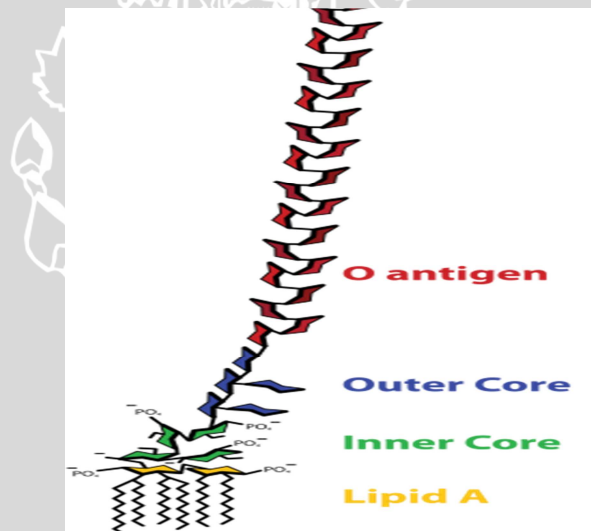
Gambar 2.1 Struktur dinding sel bakteri Gram negatif (Hogg, 2005)

Menurut Wang & Quinn dalam Kuswantoro (2012), struktur LPS terdiri dari tiga bagian utama, yaitu lipid A, inti oligosakarida, dan rantai lipopolisakarida dengan unit yaitu rantai-O spesifik (O-antigen) (**Gambar 2.2**). Lipid A yang merupakan bagian terdalam dari struktur LPS yang berfungsi melekatkan LPS pada membran. Lipid A ini tersusun atas fosfolipid yang terhubung dengan inti oligosakarida. Inti oligosakarida dihubungkan oleh gula *2-keto-3-deoxy-D-manno-2-octulosonate* (KDO) yang diakhiri oleh bagian O-antigen. O-antigen adalah bagian terluar LPS yang tersusun atas rantai oligosakarida rantai berulang. O-antigen ini merupakan komponen immunodominan (komponen antigenik) pada permukaan sel bakteri.

2.2 Patomekanisme Induksi LPS pada Otak

Otak merupakan organ tubuh bagian dari sistem saraf yang termasuk dalam susunan saraf pusat (Freudenrich, 2001 dan Kuntarti, 2007). Otak berfungsi untuk mengkoordinasi, mengontrol, dan mengatur seluruh aktivitas

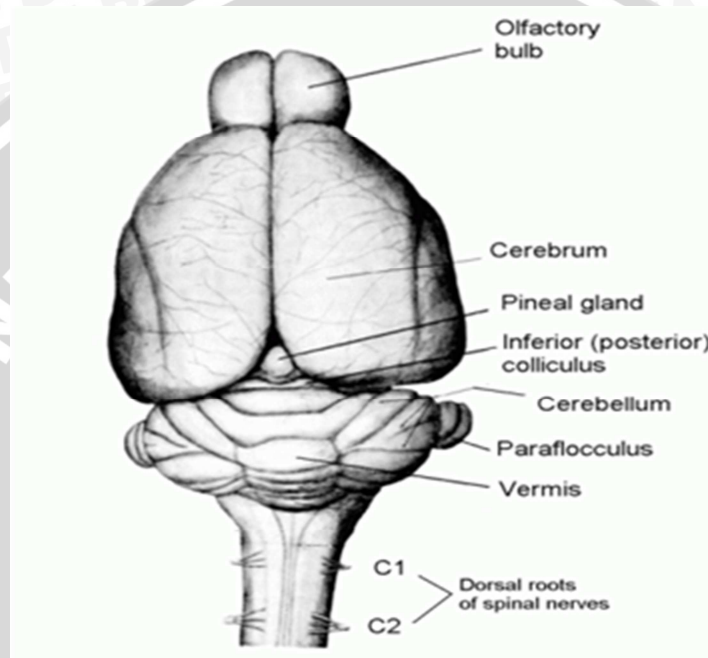
tubuh (Freudenrich, 2001). Otak vertebrata tersusun atas cerebrum, diensefalon, cerebellum, *midbrain*, pons, dan medula oblongata (Kuntarti, 2007). Masing-masing belahan memiliki empat lobus yaitu lobus frontal, lobus temporal, lobus oksipital, dan lobus parietal. Bagian-bagian otak pada tikus dapat dibagi menjadi beberapa bagian utama yaitu otak depan (*forebrain*), batang otak (*stembrain*), otak tengah (*midbrain*), serebelum, dan bulbus olfaktorius (**Gambar 2.2**). Berat otak tikus yaitu sekitar 0.5 % dari berat badan, dimana volume korteks cerebral sekitar 31 % dari total volume otak keseluruhan dan memiliki luas permukaan sekitar 6 cm² (Hedrich & Bullock, 2004).



Gambar 2.2 Struktur Lipopolisakarida (Anonim, 2013)

Menurut Hadianto (2011), patomekanisme terjadinya inflamasi otak karena infeksi bakteri Gram negatif dimulai dengan pelepasan sejumlah besar endotoksin berupa LPS. Lipopolisakarida mengikat protein spesifik dalam plasma berupa LPS *Binding Protein* (LBP). Kemudian kompleks LPS-LBP ini akan berikatan dengan CD14. CD14 merupakan reseptor membran makrofag

yang berfungsi dalam mempresentasikan LPS pada TLR4. *Toll Like Receptor-4* merupakan reseptor transduksi sinyal untuk aktivasi makrofag. Aktivasi makrofag menyebabkan pelepasan mediator inflamasi primer dari sel-sel yang



Gambar 2.3 Anatomi Otak Tikus (Kiernan, 2008)

mengalami inflamasi menyebabkan aktivasi koagulasi dan komplemen. Tubuh akan merespon dengan imunitas seluler (monosit, makrofag, neutrofil) maupun humoral dengan membentuk antibodi dan pengaktifan jalur komplemen. Inisiasi patogen oleh CD14 dan TLR4 pada membran monosit dan makrofag akan memicu pelepasan sitokin untuk aktivasi sistem imunitas seluler. Pengaktifan tersebut menyebabkan sel T akan berdiferensiasi menjadi sel T *helper-1* (Th1) dan sel Th2. Sel Th1 berfungsi untuk mensekresikan sitokin proinflamasi (TNF,

IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, dan IL-12). Sedangkan sitokin antiinflamasi IL-4, IL-10, dan IL-13 disekresikan oleh sel Th2. Selanjutnya, menurut Agustita (2013) akibat dari aktivasi makrofag menyebabkan pelepasan enzim proteolitik yang berperan dalam kerusakan sel endotel lalu menimbulkan migrasi leukosit serta pembentukan mikrotrombin sehingga menyebabkan kerusakan pada organ otak. Enzim protease berfungsi secara signifikan untuk mengatur proses fisiologi dengan mengendalikan aktivasi, sintesis dan perkembangan seluruh protein. Suheryanto & Elisa (2010) menyatakan bahwa enzim adalah protein, oleh sebab itu pengendalian metabolik dapat diketahui dengan mendeteksi perubahan profil protein yang telah terjadi.

2.3 Meningitis

Meningitis merupakan inflamasi pada meningen yang meliputi membran yang mengelilingi otak, medula spinalis, arachnoid, piamater, dan cairan cerebrospinal (CSS). Penyakit ini disebabkan salah satunya oleh bakteri (Mace, 2008). Menurut Israr (2008), klasifikasi meningitis berdasarkan penggolongan umur yaitu: neonatus yang disebabkan oleh bakteri *E. coli*, *Streptococcus sp*, dan *Listeria monocytogenes*; anak di bawah 4 tahun disebabkan oleh *Haemophilus influenza*, *Meningococcus sp*, dan *Pneumococcus sp*; anak di atas 4 tahun dan orang dewasa disebabkan oleh *Meningococcus sp*, *Pneumococcus sp*.

Mikroorganisme yang dapat menyebabkan meningitis, memasuki cairan otak melalui aliran darah di pembuluh darah otak. Cairan hidung ataupun telinga yang disebabkan oleh fraktur tulang tengkorak dapat menyebabkan

meningitis karena hubungan langsung dengan cairan otak dan lingkungan. Mikroorganisme tersebut masuk ke dalam cairan otak melalui ruangan subarakhoid. Salah satu bagian dari otak yang berperan dalam mekanisme masuknya bakteri ke dalam otak yaitu *Blood Brain Barrier* (BBB). *Blood Brain Barrier* memisahkan otak dari sirkulasi sistemik, terdiri atas dua sekat yang berbeda tapi saling berhubungan yaitu sekat antara darah dan otak yang berada di kapiler serebral dan sekat antara darah dan cairan serebrospinal (CSS) di pleksus koroideus (Stamatovic *et al.*, 2008). Sebagian besar pintu masuk mikroorganisme ke dalam otak melalui sistem saraf pusat menggunakan pleksus koroideus dan sel endotel mikrovaskuler serebri (Deli *et al.*, 2005)

2.4 Protease

Protease disebut juga peptidase, merupakan enzim golongan hidrolase yang memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana seperti menjadi oligopeptida pendek atau asam amino dengan reaksi hidrolisis pada ikatan peptida. Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Enzim ini diperlukan oleh semua makhluk hidup karena bersifat esensial dalam metabolisme protein. Selain itu, enzim ini berperan dalam tubuh untuk membantu pencernaan protein dalam makanan, menggunakan kembali protein-protein intraseluler, koagulasi sel darah dan aktivasi berbagai jenis protein, enzim, hormon, neurotransmitter, serta berperan dalam fungsi fisiologis misalnya respon imun dan inflamasi. Jika enzim protease dilepaskan, maka

menyebabkan kerusakan pada jaringan (Poliana, 2007; Naiola & Widyaastuti, 2007).

Menurut Kumar *et al.* dalam Agustita (2013), mekanisme pelepasan protease disebabkan rangsangan produk bakteri berupa LPS yang dapat memicu aktivasi makrofag berupa proses fagositosis. Sitokin berupa IL-1 dan TNF- α dihasilkan akibat aktivasi makrofag tersebut. TNF- α menyebabkan agregasi dan juga aktivasi neutrofil. Selain itu, TNF- α juga menimbulkan pelepasan enzim proteolitik sehingga berdampak kerusakan jaringan. Penelitian Hald *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa LPS menyebabkan aktivasi makrofag. Adanya aktivasi makrofag memicu disekresinya protease yang berperan dalam degradasi *extracellular matrix* (ECM).

2.5 Pengaruh LPS pada Otak

Otak merupakan organ yang sangat penting karena berfungsi sebagai pusat koordinasi metabolisme tubuh. Apabila terjadi kerusakan pada otak, maka akan menyebabkan terganggunya semua aktivitas metabolisme tubuh (Irnidayanti, 2010). Kerusakan yang terjadi di otak bisa disebabkan oleh infeksi bakteri yang memproduksi bahan toksik seperti lipopolisakarida. Lipopolisakarida inilah yang menyebabkan terjadinya kerusakan otak yang ditandai dengan adanya ekspresi protein pada otak. Otak dapat mengekspresikan berbagai macam protein apabila terjadi perubahan metabolisme yang disebabkan oleh infeksi. Induksi LPS menyebabkan terekspresinya MMP-9. Ekspresi MMP-9 akan menurunkan kadar protein

dalam BBB seperti okludin dan juga meningkatkan permeabilitas pada pembuluh kapiler otak (Lenny, 2013).

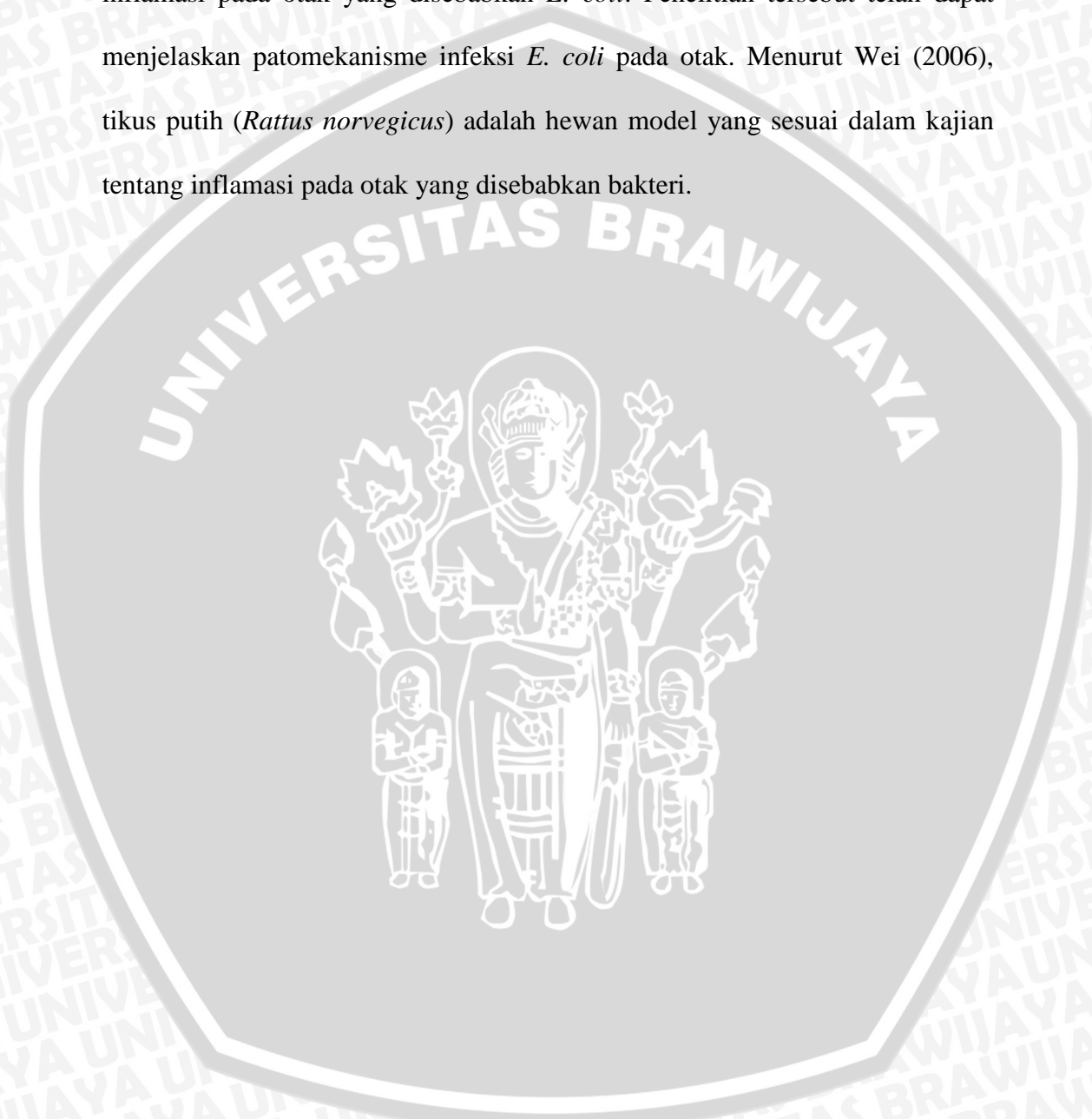
2.6 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar adalah salah satu hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian. Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini memiliki klasifikasi sebagai berikut (Myers dan Armitage, 2004 dan Suckow *et al.*, 2006) :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Sub kelas	: Theria
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Familia	: Muridae
Super family	: Muroidea
Sub familia	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Strain	: Wistar

Menurut Hedrich (2006) dan Wulandari (2011), spesies tikus putih (*Rattus norvegicus*) paling sering digunakan dalam berbagai bidang penelitian karena secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan

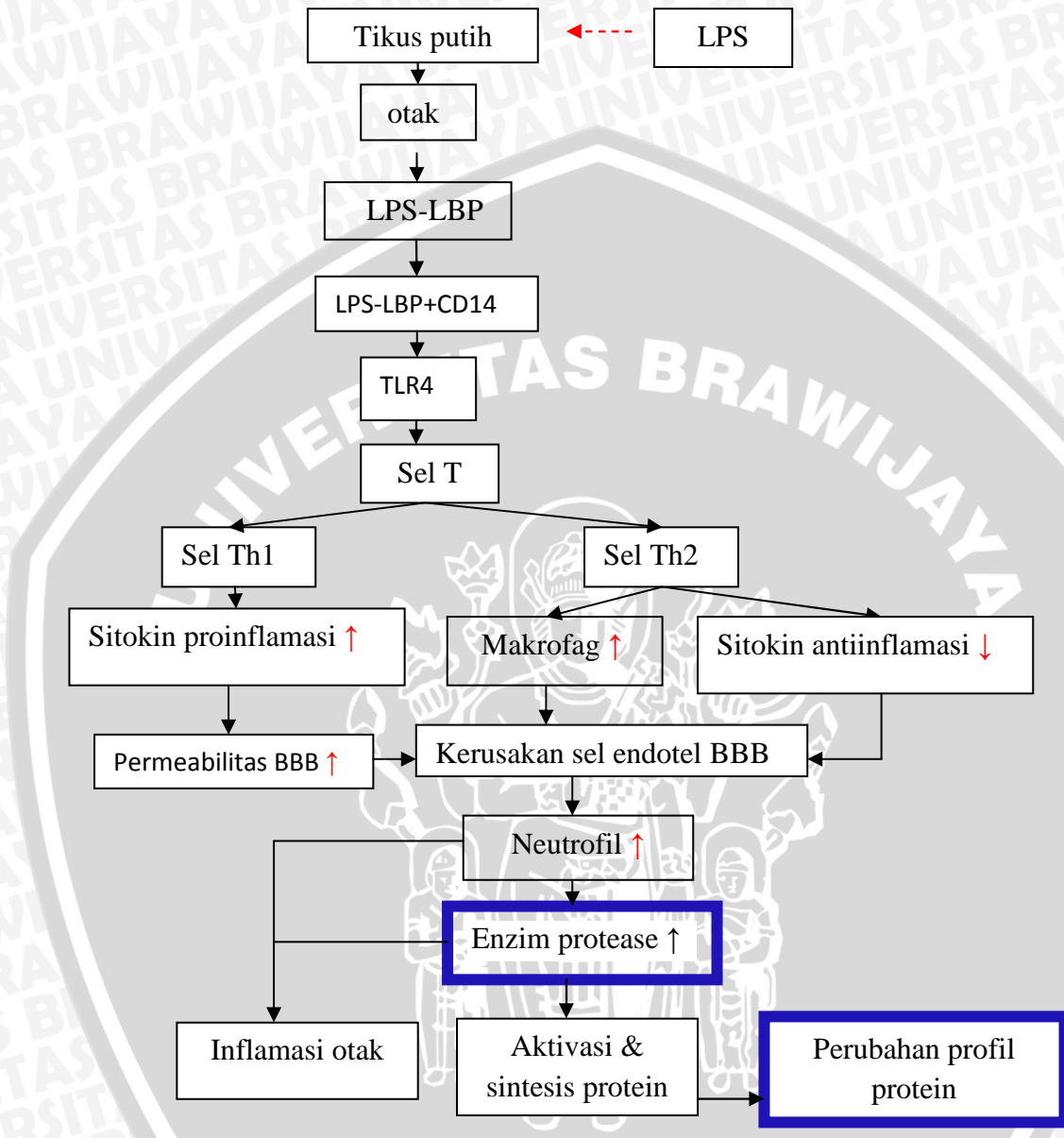
biofisik yang memiliki banyak kemiripan dengan manusia. Penelitian Omran (2012) di bidang neurologi menggunakan tikus putih sebagai hewan model inflamasi pada otak yang disebabkan *E. coli*. Penelitian tersebut telah dapat menjelaskan patomekanisme infeksi *E. coli* pada otak. Menurut Wei (2006), tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah hewan model yang sesuai dalam kajian tentang inflamasi pada otak yang disebabkan bakteri.



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Lipopolisakarida merupakan endotoksin produk bakteri Gram negatif yang dapat menyebabkan respon inflamasi. Induksi LPS akan berikatan dengan LBP membentuk kompleks LPS-LBP. Kompleks ini akan berikatan dengan CD14. Selanjutnya inisiasi LPS oleh CD14 kepada TLR4. Inisiasi CD14 dan TLR4 akan mengaktifkan imunitas seluler berupa sel T. Sel T berdiferensi menjadi Th1 dan Th2. Th1 menyebabkan peningkatan sitokin proinflamasi sedangkan Th2 menyebabkan penurunan sitokin antiinflamasi dan aktivasi makrofag. Sitokin proinflamasi menyebabkan perubahan permeabilitas *Blood Brain Barrier* (BBB), sedangkan aktivasi makrofag menyebabkan kerusakan sel endotel pada BBB. Kerusakan sel endotel BBB merangsang pelepasan neutrofil serta enzim proteolitik yakni protease. Enzim protease merupakan enzim yang berperan dalam fungsi fisiologis dengan mengendalikan aktivasi, sintesis dan perkembangan protein. Oleh karena enzim merupakan salah satu protein, maka munculnya enzim mengindikasikan adanya perubahan ekspresi dari suatu gen yang ditandai dengan perubahan profil protein. Apabila terjadi aktivasi, sintesis, dan perkembangan protein, maka akan terjadi perubahan profil protein. Adanya peningkatan enzim protease juga disebabkan oleh aktivasi neutrofil yang mengalami degranulasi. Aktivasi neutrofil tersebut berfungsi untuk mendegradasi produk-produk toksik sehingga dapat menyebabkan inflamasi pada organ otak.



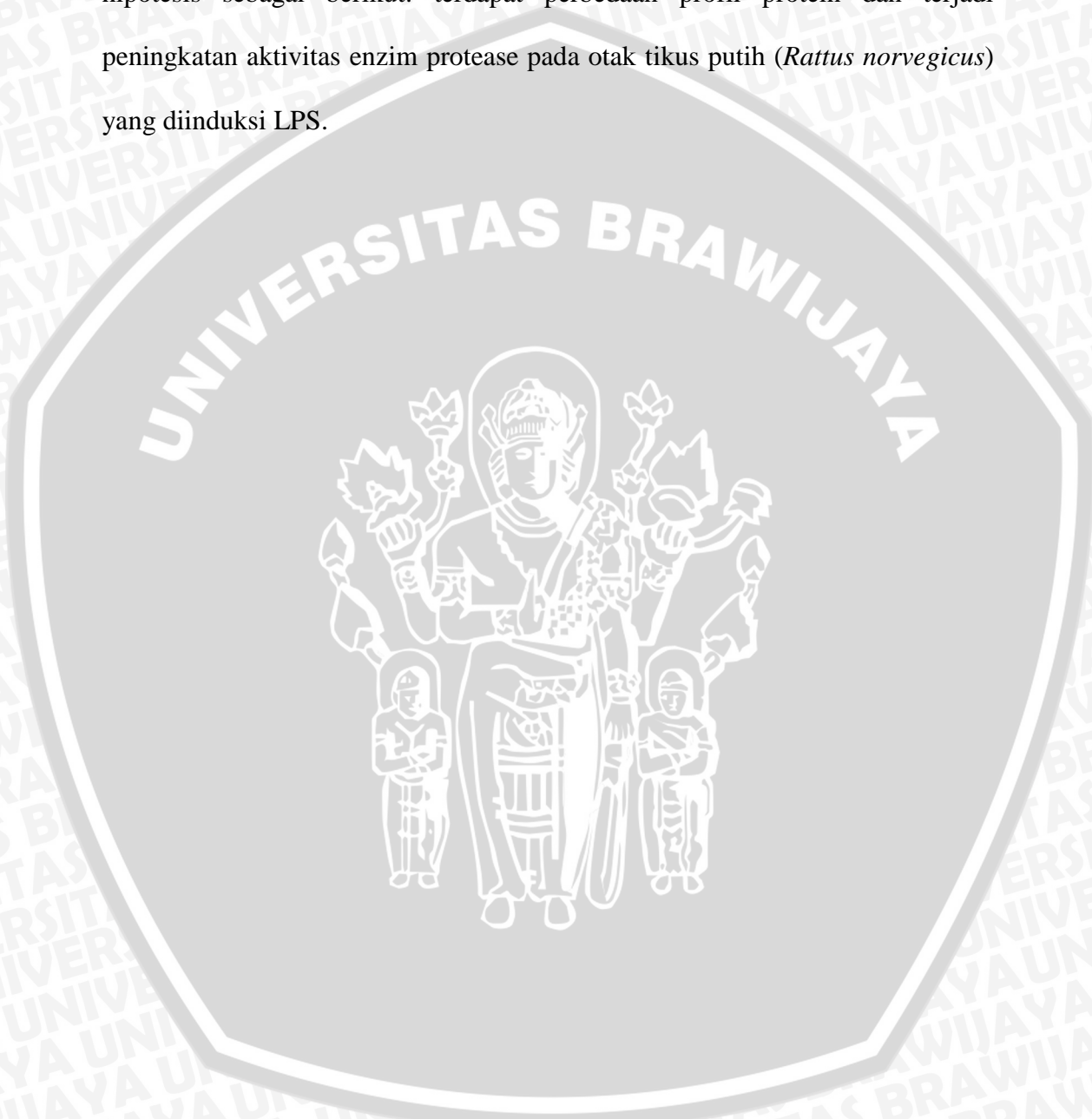
Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :

- : sel dan mediator
- : variabel yang diamati
- - -> : induksi
- ↓ : penurunan
- ↑ : peningkatan

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah dipaparkan, maka diperoleh hipotesis sebagai berikut: terdapat perbedaan profil protein dan terjadi peningkatan aktivitas enzim protease pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi LPS.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Waktu penelitian yaitu bulan Juli 2013 sampai Januari 2014.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar jantan dengan berat badan ± 150 g umur 3 minggu, LPS dari *E. coli serotype* 026B6 (Sigma), larutan PBST PMSF, etanol absolut, larutan tris HCl, NaCl fisiologis, akuades, larutan tirosin, larutan kasein, bufer fosfat, larutan TCA 4%, pasir kuarsa, enzim protease, larutan APS 10%, larutan poliakrilamida (T-akril), larutan *running buffer*, larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB), TEMED, ddH₂O, larutan *staining comassie blue*, larutan UGB, larutan LGB, larutan *separating gel* 12%, larutan *stacking gel* 3%, larutan PBS, larutan *destaining*, dan protein marker.

4.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi antara lain bak pemeliharaan hewan coba, alat bedah (gunting, *scapel*, dan *forceps*), seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas objek, labu ukur 10 mL, 1000 mL), pengaduk kaca, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), *microtube*, mortar, tabung polipropilen, lemari pendingin, autoklaf, tisu, sarung tangan, masker, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, *vortex* (Guo Hu Tuch Mayer), *disposable*

syringe 32 G 1 mL (*Terumo Syringe*), spuit, sentrifugator, sonikator (Branson 200), *timer*, spektrofotometer UV-VIS, dan seperangkat alat elektroforesis.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan dengan berat badan ± 150 g berumur 3 minggu yang didapatkan dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan RAL. Hewan coba dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok A merupakan tikus kontrol (tanpa perlakuan diberi LPS) dan kelompok B merupakan tikus yang diinduksi LPS dengan dosis 20 ng/ μ L.

Estimasi banyaknya sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (Kemas, 2005) :

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

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasar atas perhitungan tersebut, maka untuk 2 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 9 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 18 ekor tikus. Masing-masing kelompok

perlakuan terdiri atas 9 ekor tikus sebagai ulangan. Hasil penelitian akan dianalisis menggunakan uji T berpasangan (Kusriningrum, 2008).

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

- Variabel bebas : induksi LPS *E. coli serotype* 026B6 (Sigma)
- Variabel tergantung : profil protein dan aktivitas enzim protease otak
- Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus norvegicus*), umur, berat badan, dan lingkungan

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan diaklimatisasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar (**Lampiran 4**). Tikus ini juga diberi minum secara *ad libitum*. Tikus putih yang dipilih secara random dimasukkan ke dalam kandang selama 1 minggu.

4.6.2 Injeksi LPS pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Lipopolisakarida yang digunakan adalah bentuk sediaan *liquid* (cair) dengan dosis 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dosis LPS yang diberikan kepada tikus putih sebesar 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Berikut cara penghitungan dari volume (μL) LPS yang diberikan kepada tikus:

$$\text{Sediaan LPS} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$$

$$\text{Dosis} = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Volume (μL) LPS diinjeksikan kepada tikus (x)

$$\frac{1 \mu\text{g}}{1 \text{ mL}} = \frac{20 \text{ ng}}{x}$$

$$x = \frac{20 \times 10^{-9} \text{ g}}{1 \times 10^{-6} \text{ g}} \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$x = 20 \times 10^{-6} \text{ L/ekor}$$

$$x = 20 \mu\text{L/ekor}$$

Sehingga, volume yang diberikan kepada tikus sebesar 20 μL /ekor.

Preparasi hewan coba dilakukan dengan menginduksi LPS *E. coli* serotype 026B6 pada bagian intrasisternal sebanyak 20 ng/ μL kemudian diinkubasi selama 4 jam. Lokasi injeksi adalah antara *os cranial* dan *os atlas* yaitu pada sisterna magna (rongga sisterna di sekitar dasar otak). Jarum diinsersikan pada sepertiga jarak antara opistion dan basion (**Lampiran 7**). Setelah 4 jam, otak tikus diambil untuk mengetahui profil protein dan aktivitas enzim proteasenya. Injeksi intrasisternal dilakukan dengan menggunakan jarum ukuran 32 G yang disambung pada bagian ujung spuit.

4.6.3 Pengambilan otak tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Pengambilan otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan 4 jam setelah diinduksi LPS secara intrasisternal. Sebelumnya dilakukan euthanasia dengan dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada area kranial yaitu pada bagian tulang tengkorak, kemudian diambil otaknya. Otak dimasukkan ke dalam pot kecil yang berisi larutan *Phosphate Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7.4.

4.6.4 Isolasi Protein Otak Tikus

Otak dipotong kecil-kecil ditambah dengan sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan menggunakan mortar dalam kondisi dingin (di atas blok es). Proses penggerusan otak ditambah dengan *Phosphate Buffer Saline Tween Phenyl Metil Sulfonyl Fluoride* (PBST PMSF) sebanyak 5 kali volume. Homogenat dimasukkan dalam tabung polipropilen homogenat. Kemudian homogenat divorteks dan disonikasi masing-masing selama 10 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 ppm selama 15 menit selanjutnya supernatan ditambahkan etanol absolut (1:1) dan dimasukkan refrigerator *overnight* hingga terbentuk gumpalan putih. Kemudian supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Setelah itu ethanol dibuang dan diperoleh endapannya. Endapan dikeringkan sampai bau ethanol hilang dan ditambah buffer tris HCl (1:1), berikutnya disimpan pada *freezer* suhu -20°C (Susilowati, 2008).

4.6.5 Penentuan Profil Protein dengan Teknik SDS-PAGE (Aulanni'am, 2005)

Langkah-langkah yang dilakukan untuk menentukan profil protein dengan teknik SDS PAGE meliputi: persiapan gel, injeksi sampel, pewarnaan gel dan penentuan BM sampel protein (**Lampiran 6**).

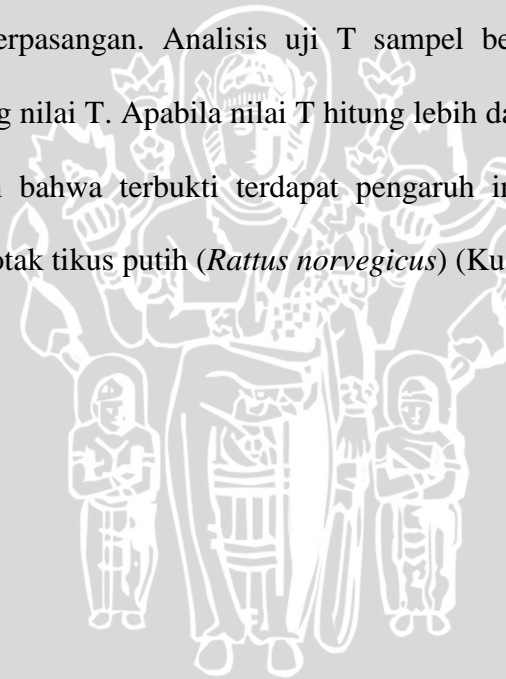
4.6.6 Pengujian Aktivitas Protease (Widyaastuti, 2013)

Pengujian aktivitas protease meliputi: pembuatan larutan stok tirosin, pembuatan larutan baku tirosin, penentuan panjang gelombang maksimum

tirosin, pembuatan kurva baku tirosin, pembuatan larutan kasein, pembuatan larutan blanko dan pengukuran aktivitas protease (**Lampiran 6**).

4.6.7 Analisis Data Statistika (Kusriningrum, 2008)

Data yang diperoleh berupa data pengamatan hasil profil protein dan data aktivitas protease. Data pengamatan hasil profil protein dianalisis secara deskriptif. Analisis deskriptif untuk data pengamatan hasil profil protein dilakukan dengan menghitung BM berdasarkan hasil migrasi pita protein. Sedangkan untuk data aktivitas protease dianalisis dengan menggunakan uji nilai T sampel berpasangan. Analisis uji T sampel berpasangan dilakukan dengan menghitung nilai T. Apabila nilai T hitung lebih dari nilai T tabel, maka dapat disimpulkan bahwa terbukti terdapat pengaruh induksi LPS terhadap aktivitas protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Kusriningrum, 2008).

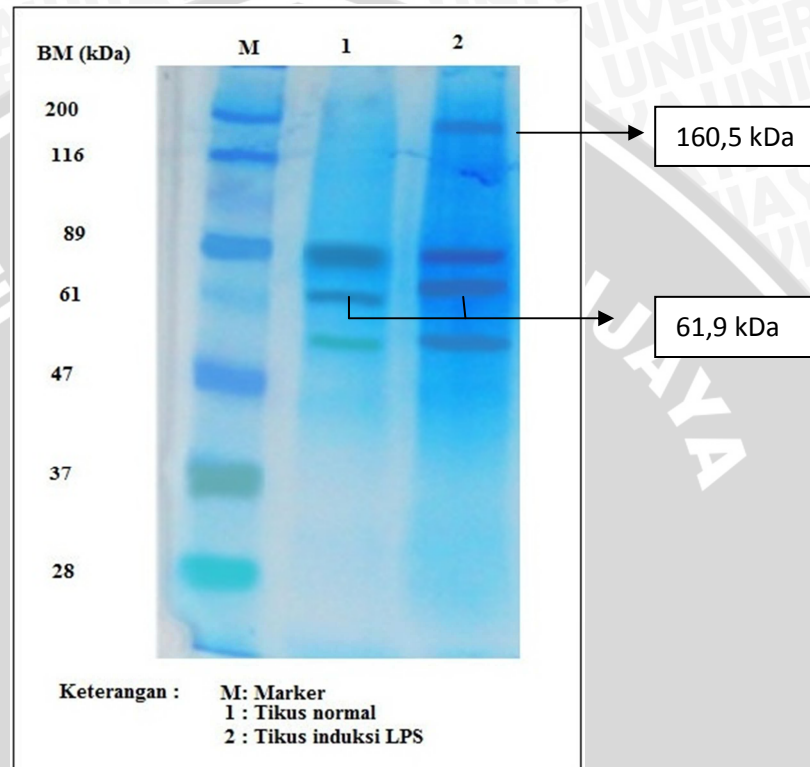


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Gambaran Profil Protein Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Induksi LPS

Induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) menyebabkan perubahan profil protein seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**. Profil protein hasil elektroforesis SDS PAGE tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara profil pita protein otak normal dan yang diinduksi LPS. Adanya pita protein dengan BM 160,5 kDa (**Lampiran 8**) pada profil protein otak yang diinduksi LPS tidak terdapat pada pita protein otak tikus normal. Protein dengan BM 160,5 kDa ini diduga merupakan Ig G. Imunoglobulin G adalah molekul dengan BM yang besar. Molekul ini memiliki BM ~160 kDa (Carlender, 2004). Molekul ini dapat masuk ke dalam darah dan mendapat akses masuk dalam ruangan interstitial jika mempunyai sistem transpor khusus yang terdapat dalam endotel kapiler otak. Sel endotel yang diikat oleh *tight junction* ini merupakan karakteristik dari BBB. *Blood Brain Barrier* merupakan bagian dari struktur Sistem Saraf Pusat yang berfungsi melindungi susunan saraf pusat dari aliran darah dan mempertahankan homeostasis lingkungan mikro. Adanya komunikasi sel antara astrosit, perisit, sel endotel dan neutrofil yang mengelilinginya berperan dalam mekanisme homeostasisnya. Adanya sistem transpor khusus menjamin SSP secara tetap menerima senyawa seperti Ig G. Sistem transpor khusus inilah yang digunakan oleh molekul Ig G untuk melewati BBB (Yuliana, 2013). Hal tersebut juga dijelaskan oleh penelitian

Xiao and Gang (2013) bahwa sistem transpor yang digunakan Ig G untuk melewati BBB adalah *neonatal Fc receptor* (FcRn). Reseptor ini berfungsi sebagai mediator dalam transpor dari darah ke otak maupun sebaliknya.



Gambar 5.1 Profil Protein Otak Tikus Putih *Rattus norvegicus* normal dan induksi LPS

Menurut Goldsby *et. al* (2000), Ig G adalah salah satu antibodi yang merupakan protein, banyak ditemukan di dalam cairan tubuh yaitu darah sekitar 80 % dari total serum. Immunoglobulin ini mempunyai dua tempat pengikatan antigen yang sama (divalen) dan dikenal empat kelas, yaitu IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4. Perbedaannya terletak pada rantai-H dengan beberapa fungsi biologis serta jumlah dan lokasi ikatan disulfida. Molekul IgG1, IgG3 dan IgG4 bisa melewati plasenta dan berperan penting dalam melindungi fetus. Molekul IgG3

adalah kelas Ig G yang paling efektif sebagai aktivator komplemen dibanding IgG1 dan IgG2, sedangkan IgG4 tidak mampu mengaktivasi semua komplemen. Molekul IgG2 berfungsi untuk melawan antigen polisakarida dan menjadi pertahanan yang penting untuk melawan bakteri terbungkus. Molekul IgG1 dan IgG2 mengikat reseptor Fc pada sel fagositik dengan afinitas yang tinggi dan sebagai mediator opsonisasi.

Mekanisme perubahan profil protein akibat induksi LPS berawal dari respon imunitas *innate* oleh makrofag. Lipopolisakarida merupakan komponen yang paling imunogenik dari dinding sel bakteri Gram negatif. Antigen ini dapat merangsang diproduksinya Ig G (Munasir, 2001). Respon imunitas melalui opsonisasi, pelapisan antigen oleh antibodi untuk mempermudah fagositosis yang dilakukan oleh sel fagosit seperti makrofag dan neutrofil. Molekul protein yang disebut Fc *receptors* (FcR), yang bisa mengikat pada *constant region* dari *subclasses* molekul Ig G ini, berada pada permukaan makrofag dan neutrofil. Ikatan antara *single* FcR dan *individual* molekul Ig G sehingga secara simultan mengikat Fc dari beberapa kompleks molekul antibodi dengan target yang sama, seperti sel bakteri. Ikatan tersebut menghasilkan ikatan yang sangat kuat sebagai proses untuk inisiasi *signal-transduction pathway* di dalam fagositosis yang melibatkan *antigen-antibody complex*. Sel fagosit yang melakukan proses *enzymatic-digestion*, *oxidative damage*, dan *membrane-damaging* peptida antibakteri. Proses tersebut dilakukan untuk membunuh organisme yang telah dikenali (Goldsby *et. al*, 2000).

Penelitian Haikal (2009) menjelaskan bahwa Ig G terlibat dalam proses *complement activation pathway* untuk membunuh patogen. Imunoglobulin G ini dapat mengaktivasi sistem komplemen melalui jalur klasik. Mekanisme aktivasi komplemen melalui jalur klasik diawali dengan *antigen-antibody complex* yang melibatkan Ig G. Jalur klasik ini merupakan jalur yang paling cepat dan efektif untuk aktivasi komplemen. *Antigen-antibody complex* akan berikatan dengan C1q. Protein komplemen yang berikatan tersebut digunakan sebagai enzim katalisator suatu rangkaian reaksi dimana protein komplemen yang lain terlibat sehingga terjadi aktivasi C1r, kemudian pemecahan C1s. Kompleks C1 berikatan dengan C4 dan memecahnya, kemudian berikatan dengan C2, sehingga dihasilkannya C4a, C4b, C2a, dan C2b. Ikatan C2b dan C2a membentuk C3 konvertase. Jalur tersebut berakhir dengan perubahan komplemen inaktif C3 menjadi bentuk yang aktif, C3a dan C3b. Komplemen C3b ini akan bergabung dengan C3 konvertase membentuk C5 konvertase yang berperan sebagai permulaan *Membrane Attack Complex* (MAC). Fungsi MAC adalah untuk merusak membran sel yang nantinya akan menghancurkan sel target.

Berdasarkan beberapa hal tersebut, Ig G sangat berperan dalam respon imunitas akibat induksi antigen berupa LPS, produk toksik dari bakteri Gram negatif seperti *E. coli*. Adanya respon imunitas humoral terhadap induksi LPS pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) menjadikan terekspresinya protein baru dengan BM 160,5 kDa merupakan salah satu alasan yang menguatkan

bahwa terbentuknya pita protein pada profil otak yang diinduksi LPS adalah Ig G (Goldsby *et al.*, 2000).

Pita protein yang muncul tidak hanya Ig G, akan tetapi juga pita protein yang diduga enzim protease. Enzim protease seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1** terkspresi pada SDS PAGE, baik pada tikus normal maupun yang diinduksi LPS. Pita protein yang muncul tersebut memiliki BM 61,9 kDa. Enzim protease memiliki BM ~60 kDa (Metayer, 2002).

Menurut Poliana (2007) bahwa enzim protease berfungsi sebagai protein intrasel. Enzim protease merupakan komponen dari sel PMN, monosit dan makrofag. Enzim protease dapat muncul pada hasil pita protein dari otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) normal. Hal ini berkaitan dengan proses isolasi protein untuk mendapatkan isolat protein dengan cara memecah isi sel. Isi sel yang keluar berupa enzim protease ini terekspresi pada pita protein otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Menurut Sargowo (2007), enzim ini dilepaskan sebagai bentuk respon imunitas nonspesifik akibat induksi LPS. Lipopolisakarida berupa produk mikroorganisme dapat melibatkan sistem TLR4 yang dapat mengaktifkan NF- κ B dan mengekspresikan gen-gen yang mengkode protein komponen respon imun nonspesifik meliputi sitokin inflamatori (TNF α , IL-1 dan IL-12). Produksi sitokin yang meningkat akan mengaktifkan sel-sel fagosit. Sel-sel fagosit (neutrofil, monosit, dan makrofag) menuju ke tempat infeksi untuk menghancurkan LPS dengan melakukan proses fagositosis. Setelah fagositosis, neutrofil dirangsang untuk melakukan percepatan pemakaian oksigen yang

diikuti oleh pembangkitan radikal oksigen toksik yang dapat merusak membran. Neutrofil yang telah dipapar LPS menjadi pecah dan mengeluarkan isi selnya, yaitu pelepasan dari unsur-unsur pokok neutrofil ke lingkungan ekstraseluler, yang diduga salah satunya adalah enzim protease. Apabila enzim protease dilepaskan, maka menyebabkan kerusakan pada jaringan. Sedangkan menurut Suheryanto & Elisa (2010), oleh karena enzim merupakan protein, maka munculnya ekspresi protein mengindikasikan adanya perubahan pada profil protein.

5.2 Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi LPS

Sesuai dengan profil protein yang muncul pada SDS PAGE, diketahui adanya ekspresi protein pada tikus normal dan tikus yang diinduksi LPS yaitu enzim protease. Untuk mengetahui pengaruh induksi LPS terhadap peningkatan aktivitas protease, maka dilakukan uji aktivitas protease. Menurut Baehaki (2010), unit aktivitas protease merupakan banyaknya mikromol (μmol) tirosin yang dihasilkan ikatan peptida pada protein oleh protease pada kondisi optimum yakni pH 6,5 dengan suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit.

Aktivitas protease diukur berdasar atas produk tirosin yang dibentuk dari substrat kasein menggunakan isolat *crude* protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*). Aktivitas protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) sesudah diinduksi LPS lebih tinggi dibandingkan dengan sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa induksi LPS sebesar $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ dapat menyebabkan

kerusakan pada otak yang ditandai dengan peningkatan aktivitas enzim protease.

Aktivitas enzim protease otak tikus pada kelompok yang diinduksi LPS yaitu $0,037 \pm 0,0445 \mu\text{mol/mL menit}$. Apabila dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak diinduksi LPS, maka kelompok tikus yang diinduksi LPS memiliki aktivitas enzim protease lebih tinggi daripada kelompok tikus tanpa LPS yang memiliki aktivitas enzim protease sebesar $0,003 \pm 0,0009 \mu\text{mol/mL menit}$ (**Tabel 5.1**). Hal tersebut dapat diketahui bahwa dalam patogenesis inflamasi pada otak, LPS mampu meningkatkan aktivitas enzim protease. Aktivitas enzim protease pada otak yang diinduksi LPS mengalami peningkatan sebesar 91,89% (**Lampiran 11**). Hal tersebut membuktikan bahwa terjadi peningkatan yang sangat tajam dengan diinduksinya LPS ke otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Tabel 5.1 Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Aktivitas Enzim Protease ($\mu\text{mol/mL menit}$)
Kontrol	0,003
Induksi LPS	0,037

Hasil data aktivitas enzim protease dianalisis dengan menggunakan uji T berpasangan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh induksi LPS terhadap aktivitas enzim protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hasil uji T

menunjukkan bahwa terdapat pengaruh induksi LPS terhadap aktivitas enzim protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Mekanisme diproduksinya enzim protease yang merupakan produk dari respon inflamasi dikarenakan oleh adanya paparan LPS akan direspon oleh reseptor, yaitu *Toll-Like Receptors* (TLRs). Hal ini berkaitan dengan adanya komponen LPS yang terdiri atas lipid A, polisakarida inti, dan rantai polisakarida spesifik-O. Lipid A berperan dalam sekresi sitokin dalam respon inflamasi. Lipid A bersama dengan protein LBP akan berikatan dengan CD14 dari makrofag. Adanya ikatan antara LBP dan CD14 ini mengakibatkan LPS dikenali oleh TLR4. Hal tersebut terkait bahwa TLR4 bersifat esensial bagi makrofag sebagai respon terhadap lipopolisakarida. *Toll-Like Receptors 4* membangkitkan sinyal untuk mengaktifkan faktor transkripsi berupa NF- κ B ini berfungsi untuk merangsang produksi sitokin, enzim, dan protein lainnya. Salah satu enzim yang dihasilkan adalah enzim protease (Widjaja, 2011).

Enzim protease merupakan enzim proteolitik yang dilepaskan oleh karena rangsangan LPS. Rangsangan tersebut memicu terjadinya proses fagositosis yaitu aktivasi makrofag. Makrofag menyebabkan produksi sitokin berupa IL-1 dan TNF- α . Adanya produksi TNF α menimbulkan aktivasi neutrofil. Neutrofil ini akan melekat dan bermigrasi melewati endothelium dari mikrovaskuler otak pada saat terjadi iskemik. Iskemik merupakan tanda klinis disfungsi suatu jaringan yang disebabkan berkurangnya aliran darah sehingga mengganggu kebutuhan darah dan oksigen di suatu jaringan. Sedangkan mikrovaskuler neutrofil menyebabkan pelepasan enzim proteolitik sehingga menyebabkan

stimulasi pelepasan neutrofil dari sel di sekitarnya. Hal tersebut berdampak terjadinya aktivasi neutrofil dan leukosit lainnya. Neutrofil intravaskuler merupakan komponen dari respon dari kebanyakan kerusakan jaringan dan infeksi (Dongoran, 2007).

Mekanisme dihasilkannya enzim protease sebagai respon inflamasi pada organ otak juga diperantarai oleh *Fc receptors* yang berada pada permukaan sel fagosit yaitu makrofag. Aktivasi makrofag sebagai bentuk respon imunitas nonspesifik ini berasal dari rangsangan lipopolisakarida yang diinduksikan pada otak. Reseptor Fc pada permukaan makrofag ini diikat oleh subkelas Ig G yaitu IgG1 dan IgG2. Immunoglobulin G memiliki fraksi Fc sehingga dapat berikatan dengan reseptor Fc pada makrofag. Untuk melakukan rekognisi terhadap antigen, maka fraksi Fc berikatan dengan reseptor Fc menghasilkan afinitas yang tinggi. Kemudian terbentuklah *antigen-antibody complex* yang memberikan sinyal untuk melakukan proses *enzymes-digestion* (Goldsby *et al.*,2000). Menurut Khumar *et al.* (2006), salah satu enzim yang terlibat dalam proses *enzymes-digestion* adalah enzim protease. Enzim ini dilepaskan sebagai indikasi respon imun nonspesifik dan juga terjadinya inflamasi yang menyebabkan nekrosis pada otak.

Menurut Poliana (2007) bahwa enzim protease merupakan enzim yang dilepaskan sebagai indikasi bahwa terjadi kerusakan pada jaringan. Suheryanto dan Elisa (2010) menambahkan bahwa enzim ini juga mengindikasikan terjadi perubahan profil protein. Sedangkan menurut Frisca dkk. (2009), enzim protease ini dilepaskan dari sel endotel yang teraktivasi sebagai proses inisiasi

angiogenesis. Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru baik dalam keadaan sehat maupun patologi. Menurut Merpaung (2007) bahwa mekanisme angiogenesis diawali dengan perubahan pada permukaan sel endotel. Adanya vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler dapat memicu ekstravasasi plasma protein. Proses destabilisasi membrane basalis oleh proteinase mengakibatkan sel endothelia terpisah satu sama lain dan bermigrasi. Proses aktivasi ini terjadi hingga menimbulkan percabangan dan membentuk lubang pembuluh darah. Proses tersebut disempurnakan dengan pembentukan perisit dan otot polos serta pembuluh darah yang baru membentuk jaringan seperti tiga dimensi.

Pada keadaan terjadi kerusakan jaringan otak akibat induksi LPS, proses angiogenesis berperan dalam mempertahankan kelangsungan fungsi otak. Hal ini dapat terjadi melalui terbentuknya pembuluh darah baru yang menggantikan pembuluh darah yang rusak. Mekanisme angiogenesis ini sangat berkaitan erat dengan enzim protease. Enzim protease diproduksi oleh sel-sel endotel BBB yang teraktivasi sebagai respon imunitas terhadap induksi LPS. Kerusakan pada sel-sel endotel BBB akan memicu dilepaskannya enzim protease yang merupakan unsur-unsur pokok dari neutrofil. Enzim protease dalam proses angiogenesis berperan penting dalam mendegradasi matriks ekstraseluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah. Degradasi proteolitik dari matriks ekstraseluler oleh enzim protease segera diikuti dengan migrasinya sel endotel ke matriks yang terdegradasi (Frisca dkk., 2009).



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

- 1) Induksi LPS 20 ng/ μ L dapat menyebabkan perubahan terhadap profil protein yaitu munculnya protein yang diduga Ig G dengan BM 160,5 kDa yang mengindikasikan terdapatnya respon imunitas nonspesifik dan enzim protease dengan BM 61,9 kDa yang mengindikasikan adanya kerusakan pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).
- 2) Induksi LPS 20 ng/ μ L dapat meningkatkan aktivitas enzim protease hasil isolasi otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 91,89% yang mengindikasikan terjadinya kerusakan pada otak.

6.2 Saran

Diperlukan pengujian lebih lanjut dengan metode *Imunoblotting* untuk membuktikan protein BM 160,5 kDa yang merupakan protein spesifik Ig G.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustita, M.S. 2013. Pengaruh Pemberian ACTH (Adrenocorticotropin Hormon) Terhadap Profil Protein dan Gambaran Histologi Otak pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Meningitis Hasil Injeksi LPS [Skripsi]. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya.
- Baehaki, Ace dan Rinto. 2012. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Mikroorganisme Perairan Rawa Indralaya Sumatera Selatan. Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan II. Ace76_none@yahoo.com.
- Bossu, P., D. Cutuli, I. Palladino, P. Caporali, F. Angelucci, D. Laricchiuta, F. Gelfo, Paola De Bartolo, Carlo Caltagirone and P. Laura. 2012. A Single Intraperitoneal Injection of Endotoxin in Rats Induces Long-lasting Modifications in Behavior and Brain Protein Levels of TNF- α and IL-18. *Journal of Neuroinflammation*. <http://www.jneuroinflammation.com> [18 Agustus 2013]
- Carlender, D. 2002. Avian Ig Y Antibody. In Vitro and In Vivo of Chicken Immunoglobulin G, M, and A Using Monoclonal Antibodies. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from Faculty of Medicine 119. ACTA Universitatis Uppsala. Center. Texas A&M University Kingsville.
- Deli, M.A., C.S. Abraham, Y. Kataoka and M. Niwa. 2005. Permeability Studies on In Vitro Blood-Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cell and Mol Neurobiol*. 25(1): 59-127.
- Dongoran, R.A. 2007. Jumlah Neutrofil Absolut Sebagai Indikator Keluaran Iskemik [Thesis]. Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro Semarang.
- Erny. 2012. Mekanisme Kerja ACTH 4-10 Sintetik dalam menghambat Respon Inflamasi Pada Meningitis induksi LPS melalui ekspresi TNF α , IL-1 β , PGE $_2$, Perubahan Sel Endotel Mikrovaskuler Serebral dan Jumlah Leukosit dalam Cairan Serebro Spinal [Disertasi]. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- Feng, Y.S., D.J. Philip, E.M. Stockx, Y.H. Victor and M. Adrian Walker. 2008. Endotoxin Has Acute and Chronic Effect on the Cerebral Circulation of Fetal Sheep. *American Journal of Physiology*. Vol. 296: 640-650.

Freudenrich, C.C. 2001. How Your Brain Works. <http://pustaka.ictsleman.net>. [download 14 April 2013]

Frisca, Caroline T.S., dan F. Sandra. 2009. Angiogenesis: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. JKM. 8: 174-187.

Hadianto, M.T. 2011. Perbedaan Kadar IL-8 pada Infeksi dan Noninfeksi Bakteri pada leukemia Anak dengan Demam Neutropenia. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Anak. Universitas Diponegoro. <http://eprints.undip.ac.id>. [17 Agustus 2013]

Hedrich, H.J. and G.R. Bullock. 2004. The Laboratory Mouse. Elsevier Academic Press. Amsterdam.

Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy Stock and Strains. The laboratory Rat: 71-92.

Irnidayanti, Y., W. Darmanto, dan A. Abadi. 2010. Ekspresi Level Gen mrna Protein Ekstraseluler Otak Embrio Mencit Blacks-6 UK-12 Akibat Induksi 2-Methoxyethanol: Analisis Secara Real Time PCR. *Berk. Penel. Hayati*. 15(9): 171-179.

Jawetz, M. dan Adelberg's. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Salemba Medika. Jakarta.

Kiernan, J. 2008. Anatomical Foundations of Neuroscience. Department of Anatomy and Cell Biology. University of Western Ontario. <http://instruct.uwo.html>. [27 Agustus 2013]

Kuntarti. 2007. Anatomi Sistem Saraf. <http://www.staff.ui.ac.id>. [14 April 2013]

Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Lenny, L. 2013. Penyakit Stroke. <http://www.majalahkesehatan.com> [03 Januari 2014]

Long, M.T. 2011. Overview of Meningitis, Encephalitis, and Encephalomyelitis. The Merck Veterinary Manual. <http://www.merckmanuals.com>. [08 Maret 2014]

Mace, S.E. 2008. Acute Bacterial Meningitis, *Emerg Med Clin N Am*. 38:281-317.

Marianingsih, P. 2012. Induksi Respon Pertahanan Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*) oleh Lipopolisakarida Bakteri *Pseudomonas syringae* pv.

Tabaci dan Pseudomonassyringae pv. Glycinea [Thesis]. Program Pascasarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.

Metayer, S., F. Dacheux, J.L. Dacheux, and J.L. Gatti. 2002. Comparison, Characterization, and Identification of Proteases and Proteases Inhibitors in Epididymal Fluids of Domestic Mammals. Matrix Metalloproteinases are Major Fluid Gelatinases. *Biol Reprod.* 66(5): 1219-29.

Myers P. and D. Armitage 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web. <http://animaldiversity.ummz.umich.edu>. [16 Agustus 2013].

Naiola E. dan N. Widyastuti. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease. *Jurnal Penelitian Hayati.* 13: 51 – 56.

Omran, A., J. Peng., C. Zheng., J. Xue., Xiang, Qiu-Lian., and Yin, Fei. 2012. The Expression of Interleukin-1 β and MIRNA-146A in the Cerebral Cortex of Acute *Escherichia coli* Meningitis Immature Rat Model. *Journal Infectious Disease.* 6(2): 41-47. <http://dx.doi.org>. [16 Agustus 2013]

Poliana, M.C.A.P. 2007. Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications. Springer. Dordrecht.

Radji, M. 2010. Imunologi dan Virologi. ISFI Penerbitan. Jakarta.

Sargowo, D., Sumarno, I.K.D. Muliarta, dan M. Kamaruddin. 2007. Peran Lipopolisakarida *Helicobacter pylori* terhadap Aktivitas Neutrofil pada Penderita Infark Miokard Akut melalui Degradasi Kolagen Tipe IV. *J. Kardiol Ind.* 28: 327-337.

Schumacher, V.L., L. Hinckley, X. Liao, E.T. Tulman, S.J. Geang, and J.A. Smyth. 2011. Meningitis caused by *Mycoplasma mycoides subspecies ari* in Goat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 23(3): 565-569.

Stamatovic, S.M., R.F. Keep and A.V. Andjelkovic. 2008. Brain Endothelial Cell-Junction. How to Open the Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology.* 6: 179-192.

Smith, J.S., P.J. Provost, and M.R. Paradis. Bacterial Meningitis and Brain Abscesses Secondary to Infection Disease Processes Involving the Head in Horses: seven cases (1980-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 224(5): 739-742.

Suckow, Mark A., S.H. Weisbroth., and C.L. Franklin. 2006. Second Edition The Laboratory Rat. Elsevier Academic Press. USA.

- Suheryanto dan Elisa Nurnawati. 2010. Profil Protein Bakteri Pendetoksifikasi Metilmerkuri Menggunakan Elektroforesis Gel Native. *Jurnal Kimia Indonesia*. 5 (1): 39-42.
- Susilowati, Suherni. 2008. Ekspresi Spermatogenesis Tikus Putih Setelah Induksi dengan Protein Insulin Like Growth Factor–I Complex Plasma Seminalis Kambing. *Berk. Penel. Hayati*. 14: (15-20) <http://www.berkalahayati.org>. [18 Agustus 2013]
- Todar, K. 2008. Bacterial Resistance to Antibiotics. <http://www.textbookofbacteriology.net> [18 Agustus 2013]
- Valencia, T., U. Kalsum dan Noorhamdani. 2013. Pengaruh Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica Charantia*) Sebagai Antimikroba terhadap *Escherichia coli* secara In Vitro [Skripsi]. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Wang, K.C., L.W. Fan., A. Kaizaki., Y. Pang., Z. Cai and L.T. Tien. 2013. Neonatal Lipopolysaccharide Exposure Induces Long-Lasting Learning Impairment, Less Anxiety-Like Response and Hippocampal Injury in Adult Rats. *Journal of Neuroscience* (Abstr.): 146-157. <http://www.sciencedirect.com>. [29 Agustus 2013]
- Ward, J. L., T. Matthew, M.D. Harting, Jr. M.D. Cox, M. Charles, M.D. Mercer, and W. David. 2011. Effect Ketamine on Endotoxin and Traumatic Brain Injury Induce Cytokine Production in the Rat. *Journal Trauma*. 70 (6): 1471-1479
- Wei B.P., R.K. Shepherd, R.M. Robins-Browne, G.M. Clark and S.J. O’Leary 2006. Pneumococcal Meningitis: Development of a New Animal Model. *Journal Otol Neurotol*. 27(6): 844-54. <http://globethic.net/library> [16 Agustus 2013]
- Widjaja, H. 2011. Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag dan Kadar Vitamin C dalam Cairan Intraperitoneal Mencit Bal/c dengan Sepsis [Tesis]. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Widyaastuti, V.M. 2013. Gambaran Histopatologi dan Aktivitas Protease Ileum Tikus *Rattus Norvegicus* Hasil Induksi Indometasin yang Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat [Skripsi]. Program Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.

WHO. 2005. Penyakit Bawaan Makanan Fokus Pendidikan Kesehatan. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.

Wilson, J.W., M.J. Schurr., C.L. LeBlanc., R. Ranamu-thy., K.L. Bucharan and C.A. Nickerson. 2001. Mechanism of Bacterial Pathogenicity. Program in Molecular Pathogenesis and Imunity. Department of Microbiology and Immunology, Tulane University Health Science Center, Tulan Avenue, New Orleans, USA.

Willete, A.A., G.R. Lubach, R.C. Knicmeyer, S.J. Short, M. Styner, J.H. Gilmore and C.L. Christopher. 2010. Brain Enlargement and Increased Behavioural and Cytokine Reactivity in Infant Monkeys Following Acute Prenatal Endotoxemia. *Behaviour Brain Research*. 219 (2011) 108-115. www.elsevier.com. [17 Agustus 2012]

Wulandari, K.D. 2011. Efek Probiotik pada Profil Imunohistokimia Antioksidan Superoxide Dismutase (SOD) di Ginjal Tikus yang Dipapar Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Jurusan Pendidikan Dokter Hewan. Institut Pertanian Bogor. <http://repository.ipb.ac.id>. [16 Agustus 2013]

Xiao, G., and L. Gan. 2013. Receptor-Mediated Endocytosis and Brain Delivery of Therapeutic Biologic. *International Journal of Cell Biology*. (45): 1-14.

Xu, M., Z.L. Sulkowski, P. parekh, A. Khan, T. Chen, S. Midha, T. Iwasaki, N. Shimokawa, N. Koibuchi., N.Z. and E.M. Sajdel-Sulkowska. 2013. Effects of Perinatal Lipopolysaccharide (LPS) Exposure on The Developing Rat Brain; Modeling the Effect of Maternal Infection on the Developing Human CNS. Department of Integrative Physiology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, Japan (Abstr.). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [16 Agustus 2013]

Yuliana, I. 2013. Tinjauan Histologi Sawar Darah Otak. *Berkala Kedokteran*. 9 (1): 93-99.



LAMPIRAN 1 Sertifikat Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 182-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

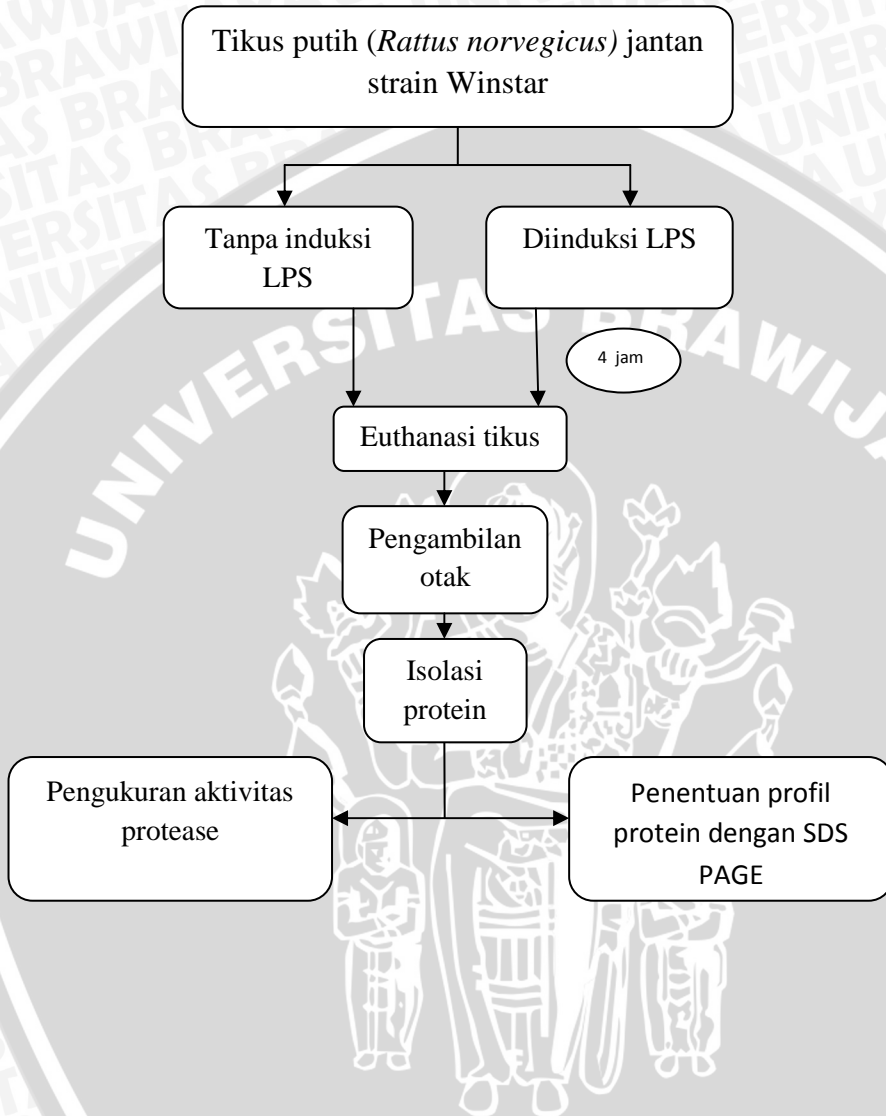
PENELITIAN BERJUDUL	:STUDI PERBANDINGAN PROFIL PROTEIN DAN AKTIVITAS ENZIM PROTEASE OTAK TIKUS PUTIH (<i>Rattus norvegicus</i>) SEBELUM DAN SESUDAH INDUKSI LPS (LIPOPOLISAKARIDA)
PENELITI	: TRY WIDYAWATI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: PENDIDIKAN KEDOKTERAN HEWAN / UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 6 Desembaer 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

LAMPIRAN 2 Alur Penelitian



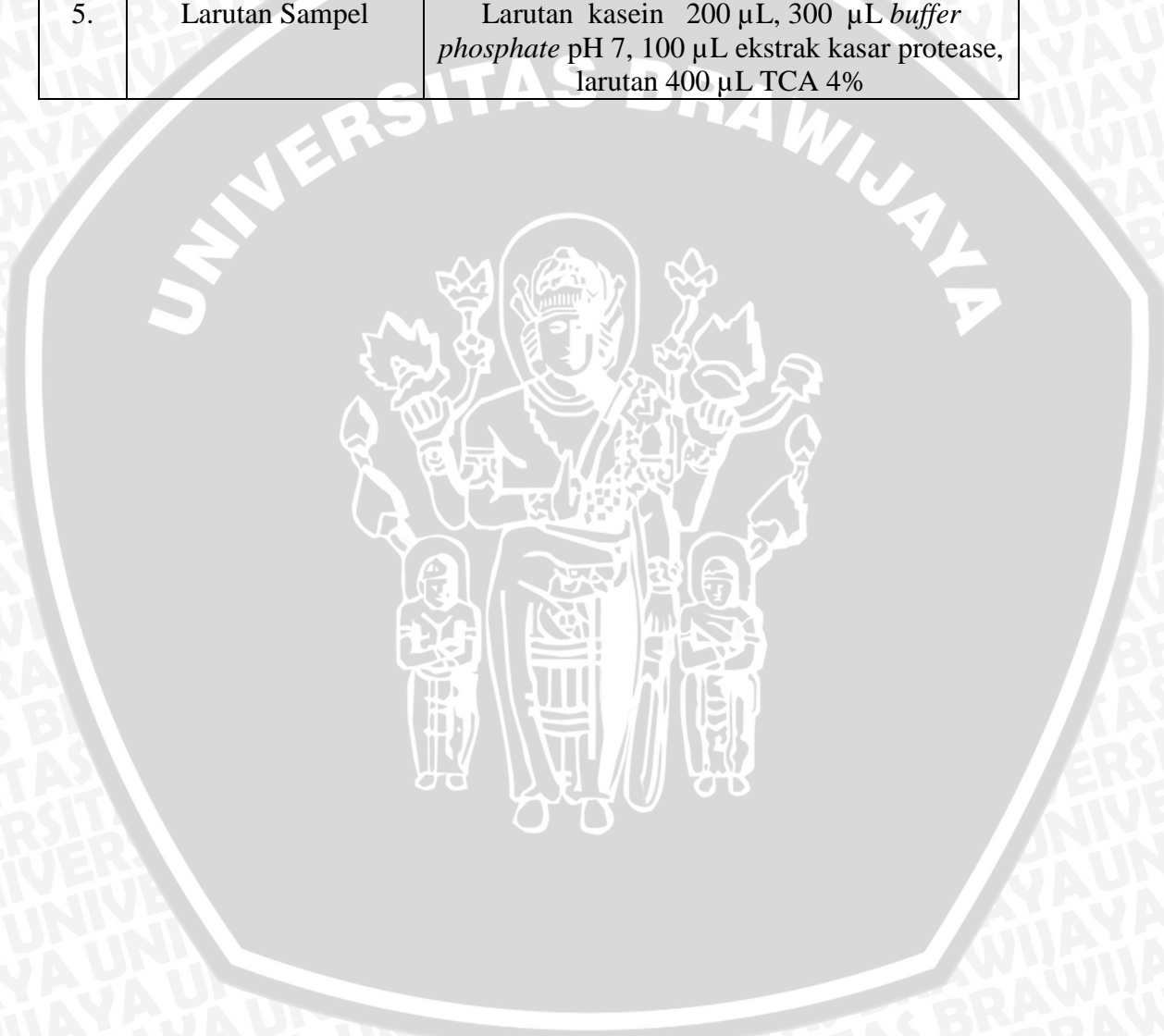
LAMPIRAN 3 Larutan-Larutan yang Digunakan dalam Penelitian

Komposisi Larutan yang Digunakan Isolasi Protein dan SDS PAGE

No.	Larutan	Komposisi
1.	Larutan PBS pH 7,4	0,2 g KCl, KH ₂ PO ₄ 0,2 g, 8 g NaCl, 2,16 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O
2.	Larutan NaCl fisiologis	9 g NaCl dan 250 mL akuades
2.	Larutan Tris-HCl	0,63 Tris-HCl dan 100 mL akuades steril
4.	Larutan RSB	0,125 µL UGB, 0,2 mL gliserol, 0,2 µL SDS, 0,05 µL merkaptoetanol dan 0,025 µL <i>Bromophenol Blue</i> , 400 µL akuades steril
5.	Larutan UGB	0,75 g <i>Tris-base</i> , 0,0401 g SDS, 5 mL akuades steril
6.	Larutan LGB	0,75 <i>Tris-base</i> , 0,4 g SDS, dan 10 mL akuades
7.	APS 10%	0,1 g amonium persulfat dan 1 mL akuades steril
8.	Larutan PBST	250 mL PBS pH 7,4 dan 1 tetes larutan <i>Tween</i>
9.	Larutan poliakrilamid	2,92 g akrilamida, 0,0801 g bisakrilamida, 7 akuades steril
10.	Larutan <i>separating gel</i> 12%	1300 µL LGB, 2000 µL poliakrilamid, 1700 µL dd-H ₂ O, 80 µL APS 10%, 8 µL TEMED
11.	Larutan <i>stacking gel</i> 3%	LGB 415 µL, 267 µL poliakrilamid, 975 µL dd-H ₂ O, 20 µL APS 10%, 2 µL TEMED
12.	Larutan <i>Staining Coomassie Blue</i>	0,25 g <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i> , 45,4 mL methanol absolut, 9,2 mL asam asetat glasial, akuades 100 mL
13.	Larutan <i>destaining</i>	7 mL asam asetat, 7 mL methanol absolut, akuades sampai tanda batas

Komposisi Larutan yang Digunakan Uji Aktivitas Protease

No.	Larutan	komposisi
1.	Larutan Stok Tirosin	0,025 g tirosin dan 25 mL akuades
2.	Larutan Kasein	0,025 g kasein dan 25 mL akuades
3.	Larutan TCA 4%	4 g TCA, 100 mL <i>buffer phosphate</i> pH 7
4.	Larutan Blanko	200 µL akuades steril, 300 µL <i>buffer phosphate</i> pH 7, 100 µL ekstrak kasar protease, larutan 400 µL TCA 4%
5.	Larutan Sampel	Larutan kasein 200 µL, 300 µL <i>buffer phosphate</i> pH 7, 100 µL ekstrak kasar protease, larutan 400 µL TCA 4%



LAMPIRAN 4 Komposisi Pakan BR1 untuk Tikus

Komposisi Pakan BR1 untuk Tikus

Kadar air	13 %
Protein	23 %
Lemak	5%
Serat	5%
Abu	7 %
Kalsium	0,30%
Fosfor	0,60 %



LAMPIRAN 5 Penentuan Profil Protein dengan Teknik SDS PAGE

(Aulanni'am, 2005)

5.1 Persiapan Gel

Dua plat kaca dirangkai dengan jarak ± 1 mm. Pembuatan gel sebanyak dua lapis digunakan untuk mengumpulkan sampel (*stacking gel*) dan gel untuk memisahkan protein (*separating gel*). Campuran larutan *separating gel* dimasukkan ke dalam *plate* dengan menggunakan mikropipet. Gel dibiarkan selama 10-30 menit hingga memadat. Kemudian *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* sambil dipasang sisir sampai terbentuk gel dan sumurannya. Setelah didiamkan 30 menit dan terbentuklah gel, sisir diangkat dan *plate* dipasang pada alat elektroforesis. Larutan buffer dituang ke dalam bejana elektroforesis.

5.2 Injeksi Sampel

Ekstrak kasar protein sebanyak 15 μ L ditambahkan larutan *Reducing Sample Buffer* (RSB) dengan perbandingan volume 1:1 lalu dimasukkan ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam penangas selama 3 menit dengan suhu 100° C. Setelah sampel didinginkan, dimasukkan ke dalam sumuran gel. Protein standar juga dimasukkan dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Kemudian anoda dihubungkan dengan reservoir bawah sedangkan katoda dengan reservoir atas. Arus listrik yang digunakan untuk menghidupkan *power supply* adalah sebesar 30 mA. Proses *running* dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian $\pm 0,5$ cm dari batas bawah *plate* gel.

5.3 Pewarnaan Gel

Pewarnaan gel dilakukan dengan cara merendam gel ke dalam larutan *staining* selama 30-60 menit. Pewarnaan bisa menggunakan larutan *Comassie Brilliant Blue R-250* ataupun AgNO_3 . Warna dihilangkan menggunakan larutan *destaining* sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjernih. Lalu hasil elektroforesis di-*scan* atau dipotret dan didokumentasikan.

5.4 Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul dilakukan dengan cara menghitung *Retardation factor* (Rf) atau *Mobilitas rate* (Mr) menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (a)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (b)}}$$

Nilai Rf yang diperoleh digunakan sebagai sumbu X dan massa molekul relatif ditempatkan sebagai sumbu Y sehingga diperoleh persamaan regresi linier $Y = ax + b$. Persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul relatif dari protein sampel. Berat molekul protein sampel didapatkan dengan menggunakan rumus $BM = \text{Antilog } Mr \text{ protein sampel}$.

LAMPIRAN 6 Langkah-langkah Pengujian Aktivitas Protease
(Widyaastuti, 2012)

6.1 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

Untuk membuat larutan stok tirosin, maka tahapan yang perlu dilakukan antara lain: 0,025 g tirosin dilarutkan dengan 25 mL akuades, diaduk dengan pengaduk magnetik, dipindah ke dalam labu ukur 50 mL, diencerkan hingga tanda batas, dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan stok tirosin diperoleh dengan konsentrasi 500 ppm.

6.2 Pembuatan Larutan Baku Tirosin

Tahapan yang perlu dilakukan untuk membuat larutan baku tirosin diantaranya: 4 mL larutan baku tirosin 500 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas, larutan baku tirosin 20 ppm dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL, dimasukkan masing-masing ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Diperoleh larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm.

6.3 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum, maka larutan baku tirosin 20 ppm diukur absorbansinya sehingga diperoleh λ maksimum yang digunakan untuk mengukur absorbansi sampel dan blanko.

6.4 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam *microtube*. Larutan masing-masing tersebut diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin 275 nm. kemudian kurva bau tirosin dibuat berdasarkan hasil absorbansi masing-masing larutan.

6.5 Pembuatan Larutan Kasein

Tahapan pembuatan larutan kasein berturut-turut adalah: 0,025 g kasein dilarutkan dengan 25 mL akuades, diaduk dengan pengaduk magnetik, dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL, diencerkan hingga tanda batas, diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Kemudian larutan stok kasein 500 ppm didapatkan.

6.6 Pembuatan Larutan Blanko

Untuk membuat larutan blanko, maka yang harus dilakukan antara lain: akuades steril dipipet 200 μ L, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7, ditambah 100 μ L ekstrak kasar protein, diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit, ditambah 400 μ L larutan TCA 4%, didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Langkah selanjutnya adalah dipipet 100 μ L, ditambah bufer fosfat 5x volume sampel, diukur serapannya pada $\lambda= 275$ nm.

6.7 Pengukuran Aktivitas Protease

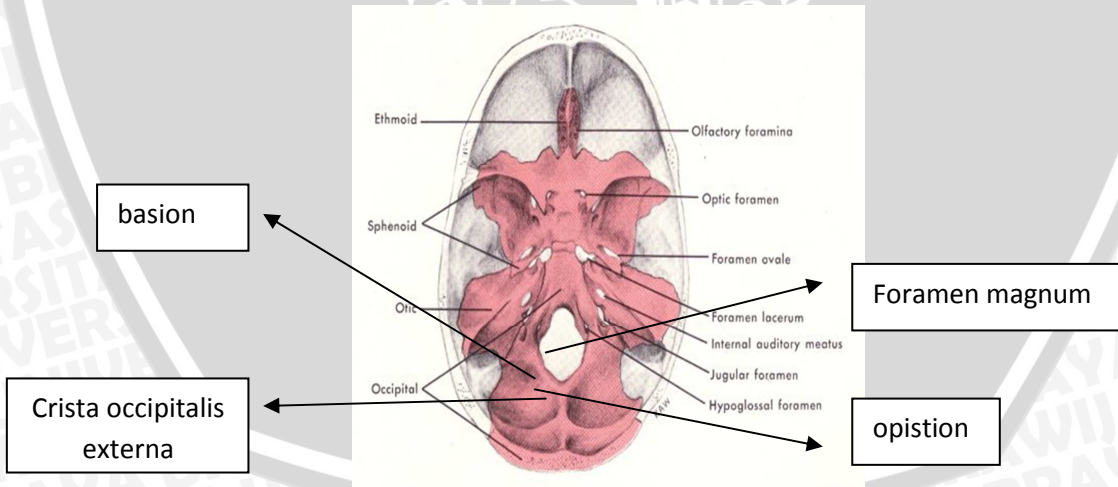
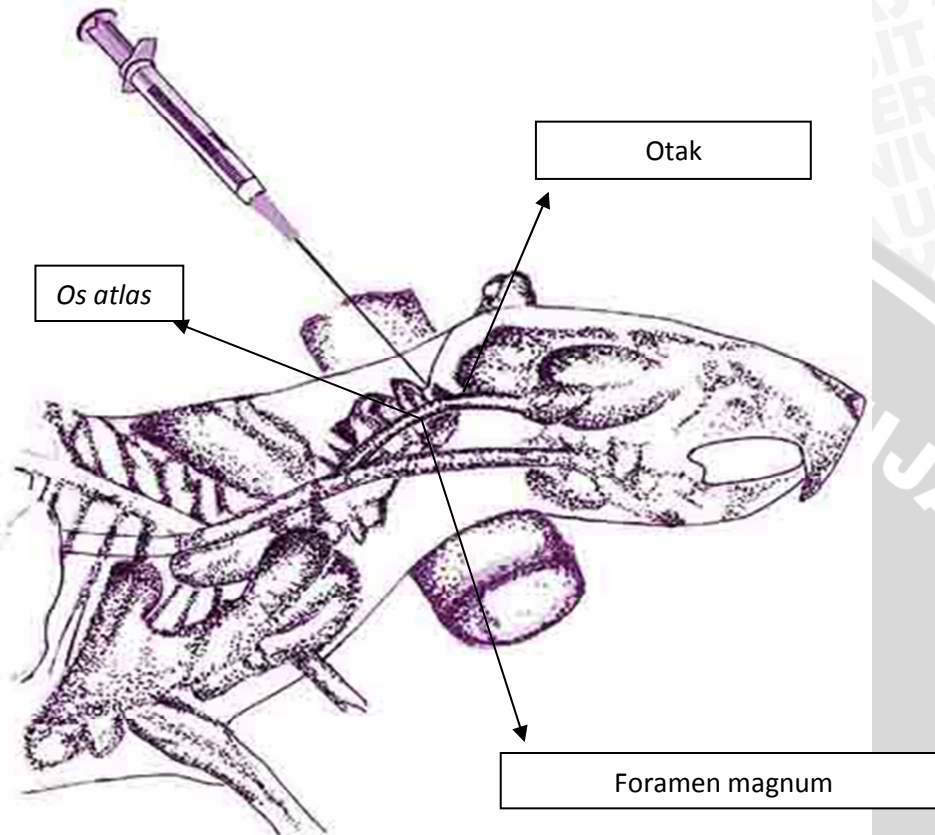
Beberapa tahapan untuk mengukur aktivitas protease diantaranya: larutan kasein 500 ppm dipipet sebanyak 200 μ L, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7, ditambah 100 μ L ekstrak kasar

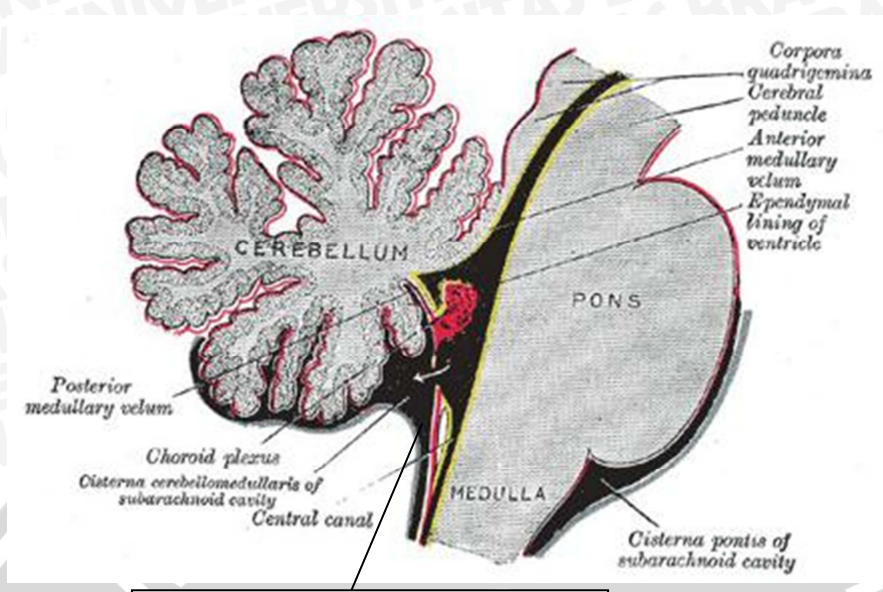
protein, diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit, ditambah 400 µL larutan TCA 4%, didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit, disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Endapan dan supernatan diperoleh. Kemudian, supernatan dipipet 100 µL dan ditambahkan buffer fosfat sampai 5x volume sampel. Selanjutnya sampel dibaca pada $\lambda = 275 \text{ nm}$.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN 7 Lokasi Injeksi Intracisternal





Sisterna magna/serebelomedularis

Keterangan Gambar:

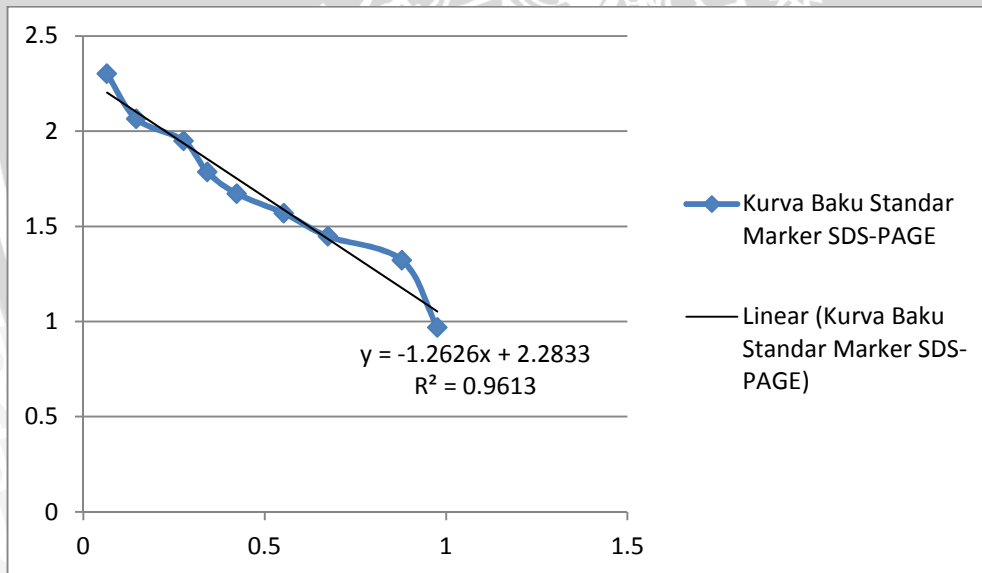
Cara penyuntikan LPS adalah secara intrasisternal (rongga sisternal di sekitar dasar otak yaitu sisterna magna) . Lokasi penyuntikan adalah antara otak (os cranial) dengan os atlas yaitu pada sepertiga jarak antara opistion dan basion. Opistion dan basion merupakan bagian dari foramen magnum (lubang besar, tempat keluarnya sumsum tulang belakang/medula spinalis), dimana opistion (*mid-point*/titik tengah dari tepi bagian posterior foramen magnum) sedangkan basion (*mid-point*/titik tengah dari tepi bagian anterior foramen magnum).

LAMPIRAN 8 Perhitungan Berat Molekul

Untuk mengetahui Berat Molekul protein sampel, maka terlebih dahulu harus membuat kurva baku protein standar (Marker) terlebih dahulu. Berikut adalah kurva protein standar yang diperoleh.

Berat Molekul Marker

BM	log BM (y)	a	b	rf (x)
200	2,30103	06	6,3	0,09523
116	2,06445	1,1	6,3	0,17460
89	1,94939	1,9	6,3	0,30158
61	1,78533	2,2	6,3	0,34920
47	1,67209	2,4	6,3	0,38095
37	1,56820	3,4	6,3	0,53968
28	1,44715	4,6	6,3	0,73015



1. a = 0,5 cm; b = 6,3 cm

Rf diperoleh dengan cara : $Rf(x) = \frac{a}{b} = \frac{0,5}{6,3} = 0,05$

Kemudian nilai Rf (x) dimasukkan ke dalam persamaan linier kurva baku

standar Marker, $M_r(y) = -1.262x + 2.283$, maka nilai $y = 2,21$. Untuk menghitung nilai BM yaitu $BM = \text{antilog } M_r(y)$.

$BM = \text{antilog } 2,21 = 160,5 \text{ kDa}$

Jadi, BM protein otak adalah 160,5 kDa.

2. a = 2.5 cm ; b = 6,3 cm

$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{2,5}{6,3} = 0,39$$

BM = antilog 1,79

$$= 61,9 \text{ kDa}$$

Jadi, BM sampel ke-2 protein otak normal dan yang diinduksi LPS adalah 61,9 kDa.

Berat Molekul Protein Otak Tikus non LPS (normal)

Pita ke -	a	b	Rf	$M_r(y)$	BM
1	1.9	6.3	0.3016	1.9160	82.4198
2	2.5	6.3	0.3968	1.7919	61.9450
3	2.7	6.3	0.4286	1.7505	56.3082

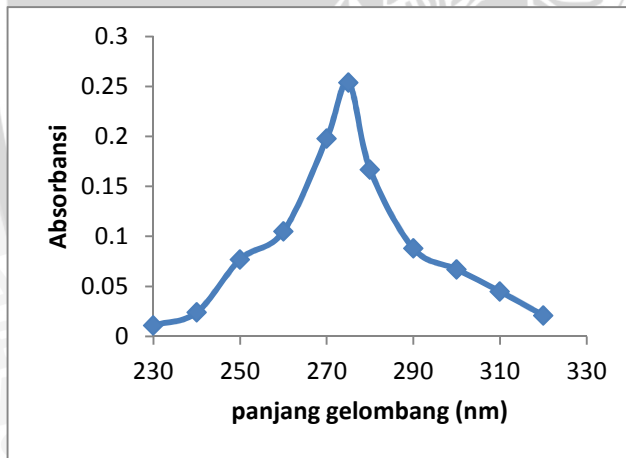
Berat Molekul Protein Otak Tikus LPS

Pita Ke-	a	b	Rf	$M_r(y)$	BM
1	0.5	6.3	0.0794	2.2056	160.5415
2	1.9	6.3	0.3016	1.9160	82.4198
3	2.5	6.3	0.3968	1.7919	61.9450
4	2.7	6.3	0.4286	1.7505	56.3082

LAMPIRAN 9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Absorbansi Larutan Standar Tirosin 20 ppm

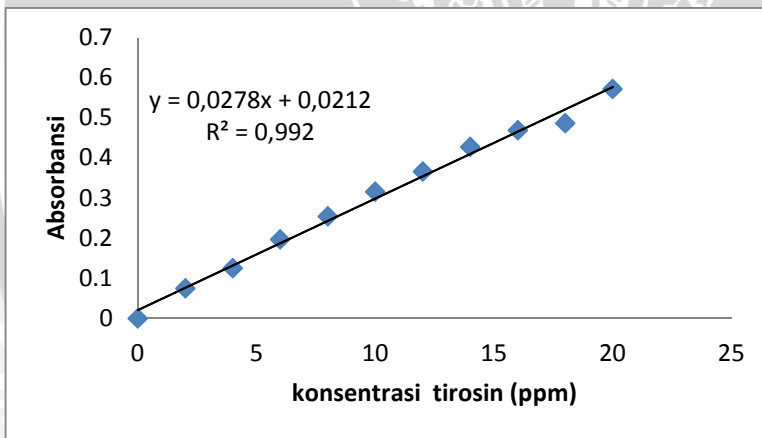
Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
230	0.011
240	0.024
250	0.077
260	0.105
270	0.198
275	0.254
280	0.167
290	0.088
300	0.067
310	0.045
320	0.021



LAMPIRAN 10 PEMBUATAN KURVA STANDAR

Absorbansi Larutan Standar Tirosin λ 275 nm

Konsentrasi tirosin (ppm)	Absorbansi
0	0
2	0.075
4	0.125
6	0.197
8	0.254
10	0.316
12	0.366
14	0.427
16	0.469
18	0.486
20	0.572



Data Absorbansi Tirosin

Kelompok	Absorbansi tirosin								
non LPS	0,035	0,035	0,045	0,034	0,041	0,045	0,047	0,034	0,042
LPS	0,255	0,204	0,203	0,267	0,251	0,256	0,245	0,286	0,246

LAMPIRAN 11 Perhitungan Aktivitas Protease

Cara Menghitung Aktivitas Protease

Aktivitas protease dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Keterangan :

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

Mr = Massa relatif tirosin 181 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

Berdasarkan rumus tersebut, maka untuk menghitung aktivitas protease, konsentrasi tirosin (x) dihitung dengan menggunakan persamaan yang telah diperoleh melalui kurva baku tirosin.

Misal : untuk menghitung aktivitas protease sampel non LPS yang memiliki absorbansi tirosin sebesar 0,035, maka :

$$x = \frac{y - 0,0212}{0,0278}$$

$$x = \frac{0,035 - 0,0212}{0,0278}$$

$$x = 0,496$$

Setelah diperoleh nilai konsentrasi tirosin, aktivitas protease dapat dihitung menggunakan rumus yang sudah ditentukan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim Protease} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

$$= \frac{0,496 \mu\text{g/mL}}{181 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5$$

$$= 0,002 \mu\text{mol/mL.menit}$$

$$= 0,002 \text{ unit}$$

Banyaknya jumlah mikromol yang terbentuk oleh 1 mL protease per menit menyatakan satu unit aktivitas protease.

Hasil Data Aktivitas Protease

Kelompok	Aktivitas Protease								
	non LPS	0,002	0,002	0,004	0,002	0,003	0,004	0,004	0,002
LPS	0,039	0,030	0,030	0,041	0,038	0,039	0,037	0,044	0,037

Berdasar atas hasil data aktivitas protease di atas, dapat diketahui rata-rata aktivitas enzim protease kelompok non LPS adalah 0,003 dengan SD sebesar 0,00092 sedangkan aktivitas enzim protease dan SD kelompok LPS berturut-turut adalah 0,037 dan 0,0045.

Induksi LPS dapat meningkatkan aktivitas protease otak tikus putih (*Rattus norvegicus*). Prosentase peningkatan aktivitas enzim protease dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Peningkatan aktivitas protease (\%)} = \frac{\text{rataaan otak LPS} - \text{rataaan otak tanpa LPS}}{\text{rataaan otak LPS}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,037 - 0,003}{0,0037} \times 100\%$$

$$= 91,89\%$$

LAMPIRAN 12 Data dan Uji Statistik Aktivitas Protease

Analisis Uji Nilai T Aktivitas Enzim Protease

Aktivitas Enzim Protease Otak Tikus Putih Sebelum dan Sesudah Injeksi LPS

Ulangan	aktivitas protease		selisih (A-B)	(A-B) ²
	sebelum induksi LPS	sesudah induksi LPS		
1	0.002	0.039	-0.037	0.001
2	0.002	0.030	-0.028	0.001
3	0.004	0.030	-0.026	0.001
4	0.002	0.041	-0.039	0.002
5	0.003	0.038	-0.035	0.001
6	0.004	0.039	-0.035	0.001
7	0.004	0.037	-0.033	0.001
8	0.002	0.044	-0.042	0.002
9	0.003	0.037	-0.034	0.001
Total	0.027	0.335	-0.309	0.011
Rata2	0.030	0.037		

Uji nilai T Sampel Berpasangan:

$$t_{hitung} = \frac{|\bar{A}-\bar{B}|}{s_{(\bar{A}-\bar{B})}} \Rightarrow S_{(\bar{A}-\bar{B})} = s / \sqrt{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(A-B)^2 - \{\sum(A-B)\}^2/n}{(n-1)}}$$

$$s = \sqrt{\frac{0.011 - (-0.309)^2/9}{8}}$$

$$s = \sqrt{\frac{0.011 - 0.010}{8}}$$

$$s = \sqrt{\frac{0.001}{8}}$$

$$s = 0,01$$

$$t_{hitung} = \frac{|\bar{A} - \bar{B}|}{s(\bar{A} - \bar{B})}$$

$$t_{hitung} = \frac{|0,003 - 0,037|}{0,01}$$

$$t_{hitung} = \frac{|-0,034|}{0,01}$$

$$t_{hitung} = 3,4$$

$$t_{tabel\ 0,05\ (derajat\ bebas\ 8)} = 2,306$$

$$t_{tabel\ 0,01\ (derajat\ bebas\ 8)} = 3,355$$

Diperoleh $t_{hitung} = 3,4$ dan $t_{tabel\ 0,01} = 3,355 \rightarrow$ maka $t_{hitung} > t_{tabel\ 0,01}$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh induksi LPS terhadap aktivitas enzim protease.

