

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari 2017 sampai bulan Juni 2017. Tempat penelitian meliputi Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : kandang tikus, botol tempat minum tikus, sekam dari parutan kayu halus, sarung tangan, neraca digital, selonsong silinder besi 40 gram, spuit 5 ml, vacutainer non-EDTA, EDTA tube 3 ml, tempat organ, tisu, blue tip, yellow tip, white tip, appendoff, sentrifugator, masker, alat bedah tikus, alat sonde, freezer, gelas beaker, spektrofotometer, plate, incubator, vortex, preparat, mikroskop dengan perbesaran 400 x, tabung propilen, labu ukur 10 mL, labu ukur 50 mL, labu ukur 100 mL, spektrofotometer UV.

3.2.2Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : tikus putih (*rattus norvegicus*), pakan sp, paraffin, , alcohol, xylol I, xylol II, aquadest, larutan PBS, H₂O₂, antibody primer rat anti IL-10, antibody sekunder biotin, lartan SA-HRP (strep Avidin Horse Radish Peroxidase), larutan DaB (Diamino Benzidine), akuades, Tirosin, Kasein, NaOH, Larutan Buffer Fosfat pH 7, Enzim Protease, Larutan TCA 4%,

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu rancangan penelitian yang dipergunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam. Pengukuran parameter interferon gamma pada plasma dasah serta imunohistokimia interleukin-10 otak dilakukan post test only. Hewan coba tikus (*rattus norvegicus*) dalam penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada table. Adapun skema kelompok perlakuan dan skema kerja penelitian secara lengkap dapat dilihat pada lampiran.

Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang akan digunakan dalam penelitian harus memiliki dua criteria, yaitu:

- a. Kriteria inklusi, yaitu persyaratan umum yang harus dipenuhi oleh subyek penelitian atau populasi agar dapat diikutsertakan dalam penelitian. kriteria ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan, berat 300-350 gram, umur 2-3 bulan sehat dan tidak cacat.
- b. Kriteria eksklusi atau criteria penolakan, yaitu keadaan yang menyebabkan subyek penelitian yang memenuhi criteria inklusi tetapi tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian. criteria ini adalah tikus yang mempunyai cedera otak.

Tabel 3.1 Rancangan kelompok penelitian

Variable yang diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Aktivitas protease dan imunohistokimia otak					
Kelompok K- (Kontrol negative)					
Kelompok K+ (Kontrol positif)					
Kelompok induksi ekstrak kulit manggis					
Kelompok induksi minocycline					

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n-1) \geq 15$, dimana (p) adalah banyaknya perlakuan dan (n) adalah banyaknya ulangan, perhitungan ulangan sebagai berikut :

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

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

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

ulangan dilakukan menurut perhitungan secara matematis adalah 5 untuk setiap kelompok perlakuan. Untuk menghindari terjadinya kegagalan atau kematian selama perlakuan diberikan cadangan sebanyak 3 ekor untuk setiap kelompok perlakuan. Sehingga dalam 1 kelompok terdapat 8 ekor hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

3.3.2 Variabel Penelitian

Adapun variable yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variable bebas : pemberian ekstrak manggis dan pemberian minocycline, penjatuhan selongsong besi pada tengkorak tikus.

Variable terikat : ekspresi interferon gamma pada plasma darah dan gambaran imunohistokimia otak.

Variabel control: jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdapat 7 tikus, yaitu kelompok 1 merupakan tikus yang tidak diberi perlakuan (tikus normal), kelompok 2 merupakan tikus traumatic brain injury (control positif), kelompok 3 merupakan tikus

traumatic brain injury yang diberi ekstrak manggis dan kelompok 4 merupakan tikus *traumatic brain injury* yang diberi minocycline, skema penelitian dapat dilihat pada lampiran 1. Sebelum mendapat perlakuan, hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) diadaptasi terhadap lingkungan laboratorium selama 5 hari.

Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar sesuai kebutuhan yaitu 30 gram/ekor/hari dan air minum. Konsumsi pakan tikus per hari berkisar antara 15-30 gram/ekor/hari. Pakan yang diberikan berupa pakan standar. Tikus diletakkan dalam kandang sesuai dengan kelompok perlakuan.

3.4.2 Persiapan Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Traumatic Brain Injury

Tikus dianastesi dengan ketamin dosis 50 mg/kgBB dan xyla dengan dosis 5 mg/kgBB melalui injeksi *intramuscular*. Setelah teranastesi, tikus diletakkan dalam posisi telungkup pada papan bedah dan difiksasi keempat ekstremitasnya dengan paper klip. Kepala tikus di desinfeksi dengan alcohol 70% dan rambut bagian kepala tikus dicukur. Kepala tikus dibuka dengan digantung dari bagan tengah diantara 2 telinga ke arah frontal, hingga tampak bagian tengkorak. Kepala tikus diposisikan berada tepat dibawah selongsong silinder dengan jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara. Silinder besi seberat 40 gram dijatuhkan tegak lurus dari ketinggian 180 centimeter sebanyak 1 kali. Setelah itu kulit kepala tikus dibersihkan, kemudian dijahit dan diberi salep *gentamicin 10% topical* dan *analgesit intramuscular*.

3.4.3 Terapi Traumatic Brain Injury dengan Ekstrak Kulit Manggis dan Minocycline

Terapi dilakukan dengan cara pemberian dosis terapi ekstrak manggis dan minocycline sebesar 0,5 mL. Terapi dilakukan secara sonde lambung 1 kali sehari selama lima hari setelah penjatuhan baban pada tikus.

3.4.4 Pengambilan Organ Otak Tikus

Pengambilan sampel otak tikus dilakukan satu minggu setelah trauma, dengan cara tikus sianastesi dengan menggunakan ketamin dengan dosis 50 mg/kgBB, setelah teranastasi sempurna, tikus diletakkan dalam papan bedah. Dilakukan pemotongan leher belakang tikus seperlunya atau dipotong searah punggung ke perut seluruhnya sehingga bisa terlihat batas dari tengkorak kepala dan kulit. Tengkorak tikus di gunting seperlunya dari arah perpotongan leher. Tengkorak dibuka dengan kekuatan jari hingga terbuka dan didapatkan penampang otak dan batas-batasnya. Secara perlahan dilakukan pemotongan saraf yang masih terhubung ke otak. Dengan hati-hati otak dikeluarkan dan diletakkan dalam botol organ berisi larutan formalin 10%. Setelah itu disimpan dalam larutan PFA (paraformaldehid) 10 % untuk pembuatan preparat imunohistokimia.

3.4.5 Pengambilan Plasma Darah Tikus

Pengambilan darah tikus dilakukan dengan metode *cardiac puncture*. Pengambilan darah melalui teknik ini adalah langsung memasukkan jarum suntik ke dalam rongga jantung melalui torak. Tikus di anastesi sebelum melakukan pengambilan darah, lalu tusuk jarum sedikit di lateral area dengan denyut jantung terkuat atau tusuk jarum melalui diafragma menuju jantung di area yang teraba paling kuat denyutnya. Darah dimasukkan dalam tabung EDTA kemudian dikocok bolak-balik. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Darah yang telah disentrifugasi akan terpisah menjadi eritrosit, lapisan *buffy coat* dan plasma darah. Plasma darah dipisahkan dan disimpan dalam microtube. Kemudian disimpan dalam pendingin dengan suhu -20°C sampai akan digunakan.

3.4.6 Pengujian Aktivitas Enzim Protease

3.4.6.1 Isolasi Protein dari Plasma Darah

Plasma darah diambil sebanyak 10 μL kemudian ditambahkan larutan PBST-PMSF sebanyak 50 μL . Kemudian disonikasi menggunakan sonikator selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm 25°C selama 15 menit. Endapan dan supernatant dipisahkan, kemudian supernatant

ditambahkan etanol absolute dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Kemudian diputar dengan alat sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm 4⁰C. Supernatan dibuang, dan endapannya dikeringkan di udara bebas hingga bau etanol hilang. Kemudian ditambahkan buffer tris-HCl pH 6,8 dingin dengan perbandingan 1:1. Ekstrak Protein Plasma kemudian disimpan pada suhu -20⁰C.

3.4.6.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Disiapkan 10 labu ukur masing-masing diisi dengan larutan baku tirosin 20 ppm sebanyak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL dengan konsentrasi sebesar 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm. Kemudian ditambahkan dengan akuades hingga tanda batas dan ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok hingga homogeny. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada masing-masing konsentrasi larutan baku dengan panjang gelombang 275 nm. Blanko yang digunakan dalam pengukuran ini adalah akuades.

3.4.6.3 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Plasma

Pada tahap ini yang dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 µL, 300 µL larutan buffer fosfat pH 7, dan 100 µL enzim protease lalu didiamkan selama 60 menit pada suhu 37 0C di atas penangas air. Kemudian ditambahkan 400 µL larutan TCA 4 % secepatnya, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu 27 0C. setelah itu, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatant yang diperoleh diambil 100 µL dan diencerkan sebanyak 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λmaks tirosin sebesar 275 nm. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan dengan rumus :

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

Keterangan :

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

fp = factor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

3.4.7 Ekspresi IL-10 pada Otak dengan Metode Immunohistokimia

Untuk menentukan ekspresi IL-10 dilakukan pemeriksaan IHK, langkah dari IHK adalah preparat otak direndam ke dalam xylol I, Xylol II, alcohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), dan aquades masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Selanjutnya preparat ditetesi 3 % H₂O₂ selama 20 menit, dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diblok dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang. Preparat kemudian direaksikan dengan *antibody primer rat anti IL-10 monoclonal antibody* selama 24 jam dengan suhu 40 °C. kemudian dilakukan pencucian kembali pada preparat dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Selanjutnya preparat diinkubasi dengan *antibody sekunder biotin (rabbit anti rat igG biotin labelled)* selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Preparat ditetesi SA-HRP Preparat ditetesi SA-HRP (*Strep Avidin Hoese Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Dan ditetesi dengan DaB (*Diamino benzidine*) selama 10 menit dengan suhu ruang. Kemudian preparat dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan counterstaining menggunakan *Mayor Hematoxylen* selama 5 menit dan dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dibilas dengan aquades dan dikeringkan. tahapan terakhir di *mounting* dengan entellan dan ditutup dengan cover glass.

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x. hasil pengamatan kemudian difoto pada 5 bidang pandang. Hasil foto mikroskop kemudian diproses menggunakan *software immunoratio* untuk menghitung ekspresi dari IL-10 yang ditandai dengan sel yang terekspresi dengan bewarna kecoklatan.

3.5 Analisis Data

Analisa data kuantitatif aktivitas protease dan perhitungan ekspresi Interleukin-10 dilakukan secara statistika menggunakan uji sidik ragam *one way analysis of various* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Turkey untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi 5 % menggunakan Microsoft Office Excel dan *statistical package for the social science* (SPSS) *version 17.0 for windows*