

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian Terapi Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap Aktivitas Protease Serum Darah dan Ekspresi Malondialdehida (MDA) pada Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Traumatic Brain Injury* dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari-July 2017.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya seperangkat alat gelas, papan bedah, sarung tangan, paper clip, gunting, silinder besi 40 g dengan diameter 4 mm, botol sampel, vacutainer, pisau, *microtom rotary*, *microtube*, sentrifuge, aluminium foil, *waterbath*, oven (Memmert), *chamber*, slide, *mounting cover glass*, mikroskop, kuvet, mortar, tabung afron, sonikator, pengaduk magnetik, dan ependorff.

Bahan-bahan yang digunakan didalam penelitian ini antara lain bahan-bahan ekstrak manggis, minocycline, PBST-PMSF, pasir kuarsa, etanol, buffer Tris-HCl, aquades, tirosin, buffer fosfat pH 7, TCA 4%, xylol, buffer sitrat, PBS, PBS pH 7,4, antibody primer (MDA), BSA 2%, SA-HRP, DAB chromagen, DAB buffer, counterstrain (Mayer's Hematoxylin), dan tap water.

3.3 Tahapan Penelitian

Adapun tahap pelaksanaan program yang dilakukan adalah sebagai berikut:

Tahap-tahap penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Persiapan hewan tikus induksi TBI
2. Pengambilan otak tikus
3. Pengambilan plasma darah tikus
4. Pengambilan slide preparat histopatologi jaringan otak
5. Pengukuran MDA secara imunohistokimia
6. Pembuatan larutan stok tirosin
7. Pembuatan larutan baku tirosin
8. Pembuatan panjang gelombang maksimum tirosin

9. Pembuatan kurva baku tirosin
10. Pembuatan larutan kasein
11. Isolasi Protein
12. Pembuatan larutan blanko
13. Pengukuran aktivitas protease

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, setiap kelompok terdiri dari 5 tikus. Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian pakan standar pada semua tikus. Kelompok 1 merupakan kelompok tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa induksi TBI dan tanpa pemberian terapi minocycline dan ekstrak manggis. Kelompok 2 merupakan kelompok tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus induksi TBI. Kelompok 3 merupakan kelompok tikus induksi TBI dan diterapi minocycline dengan dosis sebanyak 0,5 mL/hari. Kelompok 4 merupakan kelompok tikus induksi TBI dan diterapi ekstrak manggis dengan dosis sebanyak 0,5 mL/hari. Skema penelitian dapat dilihat pada **lampiran 1**.

Tabel 3.1 Rancangan Kelompok Perlakuan Tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok	Perlakuan	Ulangan
----------	-----------	---------

		1	2	3	4	5
1	Kontrol negatif					
2	Kelompok positif (tikus induksi TBI)					
3	Kelompok induksi TBI dan terapi minocycline dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari selama 5 hari					
4	Kelompok induksi TBI dan terapi ekstrak manggis dengan dosis sebanyak 0,5 cc/hari selama 5 hari					

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan stain wistar dengan berat badan sebesar 300-350 gram. Perhitungan jumlah dari sampel dapat menggunakan rumus Federer sebagai berikut [45]:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

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

Keterangan:

t : jumlah kelompok perlakuan

n : jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan estimasi dari sampel di atas, maka untuk keempat kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompoknya sehingga total jumlah hewan coba tikus yang dibutuhkan sebanyak 20 ekor.

Variable yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variable bebas : perlakuan penjatuhan beban pada otak, dosis terapi ekstrak manggis
2. Variable terikat : organ otak, aktivitas protease serum, imunohistokimia MDA
3. Variabel kontrol : jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar.

Tikus dikandangkan sesuai dengan kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup, dimana setiap kandangnya terdiri dari 5 ekor tikus. Kandang tikus terbuat dari bak plastik dengan ukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup dari kawat.

3.4.2 Pemberian Terapi Ekstak Kulit Manggis dan Minocycline

Terapi minocycline diberikan pada kelompok perlakuan KB pasca TBI dengan dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari. Sedangkan terapi manggis diberikan pada kelompok perlakuan KC dengan dosis 0,5 mL/hari selama 5 hari.

3.4.3 Persiapan Hewan Tikus (*Rattus novergicus*) Model TBI

Ketamine dengan dosis 100 mg/KgBB dan xyla dengan dosis 10mg/kgBB dianestesisikan melalui injeksi intramuscular pada otot paha. Kemudian tikus diletakkan dalam posisi telungkup pada papan bedah dan difiksasi keempat ekstremitasnya menggunakan paper clip. Kepala tikus didesinfeksi menggunakan alkohol 70% dan rambut kepala tikus dicukur. Kulit kepala tikus dibuka dengan gunting dari bagian tengah hingga diantara dua telinga ke arah frontal hingga tampak bagian tengkorak. Lalu kepala tikus diposisikan berada tepat di bawah selongsong silinder dengan jarak 1 cm. Silinder besi dengan berat 40 gram dan diameter 4 mm dijatuhkan tegak lurus dari ketinggian 180 cm sebanyak 1 kali. Selanjutnya kulit kepala dibersihkan, dijahit kembali dan diberikan salep gentamicin 10% topical dan analgesic intramuscular.

3.4.4 Pengambilan otak tikus

Tikus diberi perlakuan berupa euthanasia menggunakan ketamin dengan dosis 0,2 mL dan diletakkan pada papan bedah. Selanjutnya dilakukan pemotongan leher belakang tikus atau dipotong searah punggung ke perut seluruhnya sehingga dapat terlihat batas antara tengkorak kepala dan kulit. Kulit kepala tikus di daerah lesi TBI dibuang seutuhnya. Lalu tengkorak tikus digunting seperlunya dari arah perpotongan leher. Tengkorak tersebut dibuka dengan kekuatan jari hingga terbuka dan didapatkan penampang otak dan batas-batasnya. Saraf yang masih terhubung ke otak dilakukan

pemotongan. Kemudian otak dikeluarkan secara berhati-hati dan diletakkan dalam botol organ berisi larutan formalin 10%.

3.4.5 Pengambilan Serum Darah Tikus

Tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan pembedahan. Lalu dibedah pada rongga abdomen dan diambil sebanyak 5 cc plasma darah pada bagian vena cava superior jantung. Kemudian dimasukkan ke dalam vacutainer berwarna merah.

3.4.6 Pembuatan Slide Preparat Histopatologi Jaringan Otak

Kepala tikus dipotong dengan ukuran 2 cm x 1 cm x 3 cm dan jaringan otak difiksasi menggunakan formalin 10%, kemudian direndam selama 18-24 jam. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan didehidrasi menggunakan larutan aseton selama 1 jam sebanyak 4 kali. Lalu dilakukan tahap pembersihan (*clearing*) dengan menggunakan xylol selama 30 menit sebanyak 4 kali. Selanjutnya tahap pembersihan (*impregnation*) menggunakan paraffin cair dengan suhu 55°C selama 1 jam 4 kali. Pengecoran (*blocking*) dilakukan pada paraffin blok dan disayat pada jaringan yang sudah tertanam dalam paraffin blok menggunakan mikrotom rotari dengan ketebalan 3-5 mikron dan diletakkan pada objek glass.

3.4.7 Pengukuran MDA Secara Immunohistokimia

Slide preparat sebelum dideparafinasi dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Preparat dideparafinasi dengan xylol selama 2 kali 10 menit, dimasukkan ke dalam etanol absolut selama 2 kali 10 menit. Kemudian dimasukkan dalam etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, dan 70% serta aquades) masing-masing selama 5 menit. Slide preparat direndam di dalam Chamber berisi buffer sitrat pH 6,0. Kemudian Chamber dipanaskan dalam waterbath suhu 95°C selama 20 menit. Slide dikeluarkan dari waterbath, tunggu sampai suhu ruang ± 20 menit. Slide dicuci dengan PBS selama 6 menit. Pada hari pertama slide siap untuk di IHC, ditetaskan 3% H₂O₂ dalam methanol diinkubasi selama 15 menit dan dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit. Pada *Blocking Unspesifik Protein* ditetaskan *Background Sniper*, diinkubasi 15 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit. Ditetaskan Antibodi Primer (MDA) yang dilarutkan dalam buffer PBS + 2%

BSA, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Lalu dihari kedua kedua slide preparat dikeluarkan, ditunggu sampai suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit. Diteteskan antibody sekunder, diinkubasi 30 menit pada suhu ruang dan dicuci PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit. Selanjutnya ditambahkan SA-HRP (*StrepAvidin-Horse Radish Peroksidase*) dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit dan dibilas dengan aquadest. Ditambahkan DAB (DAB Chromagen : DAB buffer = 1:50) dan diinkubasi selama 3-10 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 2 menit dan dicuci dengan aquadest 3 kali 2 menit. Diberikan counterstrain (Mayer's Hematoxylin) bersama tap water dengan perbandingan 1:10 dan diinkubasi selama 5-10 menit pada suhu ruang, kemudian dibilas dengan tap water. Dilakukan *mounting cover glass*. Selanjutnya dikeringkan hingga *entellan* kering. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop. Kadar MDA pada jaringan otak tikus dapat dihitung dengan mikroskop potret di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Preparat diletakkan pada mikroskop dengan perbesaran ocular 10x dan perbesaran obyektif 10x. Setelah terlihat jaringan otak, maka perbesaran obyektif ditambah menjadi 40x. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda supaya hasil yang didapatkan bersifat obyektif.

3.4.8 Pengukuran aktivitas Enzim Protease (serum)

3.4.8.1 Isolasi Protein

Serum darah disiapkan terlebih dahulu dan ditambah sedikit pasir kuarsa. Setelah homogenat ditambah dengan larutan PBS – Tween : PSMF (9:1) sebanyak 1 mL dan dipindahkan kedalam tabung effendorf steril. Dilanjutkan dengan *menvorteks* selama 15 menit (6000 rpm), dan selama 10 menit disonikasi dengan sonikator. Kemudian supernatannya diambil dan ditambah etanol absolute dingin dengan perbandingan 1 : 1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifuge selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris – HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1 : 1.

3.4.8.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Langkah awal dalam pembuatan kurva baku tirosin yaitu disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL untuk konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ppm. Selanjutnya ditambah aquades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok. Kemudian diukur absorbansinya pada masing-masing larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah aquades.

3.4.8.3 Pengukuran Aktivitas Protease isolasi protein

Langkah awal yang harus dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 300 μ L dan enzim protease sebanyak 100 μ L lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37°C di dalam incubator. Kemudian ditambahkan larutan TCA 4% sebanyak 400 μ L didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar). Selanjutnya diputar dengan alat sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat kemudian diukur nilai absorbansinya pada λ maksimal tirosin sebesar 280 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Satu unit aktivitas adalah sebanyak tirosin dari pemecahan 1 mL enzim protease.

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode walter (1984) menggunakan rumus :

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

q = waktu inkubasi (mL)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

3.5.9 Analisa data

Analisa data kuantitatif imunohistokimia menggunakan kadar MDA otak tikus dan perhitungan aktivitas protease sebagai marker antiinflamasi pada jaringan otak dilakukan secara statistika menggunakan uji sidik ragam *one way analysis of varians* (ANOVA). Selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi 5% menggunakan Microsoft Office Excel dan *statistical package for the social science* (SPSS) *version 16.0 for windows 7*.