

## BAB IV

### METODA PENELITIAN

#### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2016 hingga Januari 2017 bertempat di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Perawatan dan pembedahan hewan coba dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang. Analisa ekstrak ubi jalar ungu menggunakan LC-MS dikerjakan di Laboratorium Jurusan Kimia Politeknik Negeri Malang.

#### 4.2 Sample Penelitian

Pada penelitian ini digunakan tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) usia 2-3 bulan dengan berat badan 200 g - 300 g diperoleh dari Institut Biosains Universitas Brawijaya. Tikus terindikasi dalam kondisi sehat serta aktif dan dipelihara dalam kelompok (4 tikus dalam 1 kandang) dengan ukuran kandang (12 x 30 x 50cm). Jumlah tikus yang digunakan dihitung berdasarkan rumus berikut :

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$n \geq 4.75 \quad n \pm 5 \text{ Tikus}$$

t = jumlah kelompok uji

n = jumlah tikus yang diperlukan tiap kelompok uji

Berdasarkan perhitungan diatas maka total tikus yang diperlukan sejumlah 25 tikus dengan jumlah tikus masing-masing kelompok uji adalah 5.

#### **4.3 Tahapan Penelitian**

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah :

1. Pengkondisian dan preparasi tikus wistar
2. Pembuatan Stroke Iskemik Model Pada Tikus Wistar
3. Terapi dengan sonde ekstrak cair antosianin dari ubi jalar ungu
4. Pembedahan akhir dan pengambilan organ cerebellum
5. Pembuatan preparat cerebellum
6. Analisa profil protein serum darah dengan teknik SDS PAGE
7. Analisa Apoptosis dengan Imunohistokimia
8. Analisa Caspase-3 dengan Imunohistokimia
9. Analisa AIF dengan Imunohistokimia
10. Analisa hasil data secara deskriptif

#### **4.4 Variabel Penelitian**

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Perlakuan MCAO selama 3 jam dilanjutkan dengan reperfusi & terapi menggunakan ekstrak cair antosianin dari ubi jalar ungu dosis 1 x 1 hari sebanyak 2 cc @ekor tikus

Variabel terikat : Profil protein serum darah, ekspresi apoptosis sel, caspase-3, dan AIF cerebellum

Variabel kontrol : Tikus wistar umur 3-4 bulan dengan berat badan 200g - 300g

**Tabel 4.1** Tabel parameter pengamatan penelitian

Kelompok Perlakuan	Parameter Imunohistokimia yang Diamati (5 ulangan)		
	Ekspresi Apoptosis	Ekspresi Caspase-3	Ekspresi AIF
Kelompok 1 (K1) :	.....	.....	.....
Reperfusi 1 jam			
Kelompok 2 (K2) :	.....	.....	.....
Reperfusi 72 jam			
Kelompok 3 (T1):	.....	.....	.....
Terapi 24 jam			
Kelompok 4 (T2):	.....	.....	.....
Terapi 72 jam			
Kelompok 5 (KN):	.....	.....	.....
Kontrol Negatif			

#### 4.5 Prosedur Penelitian

##### 4.5.1 Pengkondisian dan Preparasi Tikus Wistar

Tikus wistar yang digunakan diadaptasikan terlebih dahulu selama 15 hari di laboratorium Institut Biosains Universitas Brawijaya. Pasca adaptasi tikus dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing kelompok membutuhkan tikus sebanyak 4 tikus berdasarkan hasil perhitungan statistik. Kelompok 1 (K1) : Kontrol positif (oklusi 3 jam reperfusi 1 jam tanpa perlakuan). Kelompok 2 (K2): Kontrol positif (oklusi 3 jam reperfusi 72 jam tanpa perlakuan). Kelompok 3 (T1): Terapi antosianin (oklusi 3 jam reperfusi 24 jam dengan terapi). Kelompok 4 (T2): Terapi antosianin (oklusi 3 jam reperfusi 72 jam dengan terapi). Kelompok 5 (KN): Kontrol negatif (tanpa perlakuan apapun).

#### **4.5.2 Pembuatan Stroke Iskemik Model Pada Tikus Wistar**

Tikus wistar dari kelompok K1 ; K2 ; T1 ; dan T2 sejumlah 20 ekor dipersiapkan untuk dioperasi induksi iskemik. Perlakuan MCAO (middle cerebral artery occlusion) dimulai dengan cara dibuat sayatan pada bagian leher bagian kiri kemudian dilakukan pengikatan pada pembuluh darah besar CCA (carotis communis artery) dan pembuluh darah percabangan CEA (carotis externa artery) selanjutnya luka sayatan dijahit agar tidak terjadi infeksi. Oklusi dilakukan selama 3 jam dilanjutkan reperfusi dengan cara jahitan dibuka kembali untuk mengambil benang pengikat pada CCA dan CEA kemudian luka sayatan ditutup kembali. Oklusi-reperfusi dilakukan agar terjadi kondisi hipoksia-hiperoksia sehingga terjadi ledakan oksigen kemudian berlanjut pada stroke iskemik model.

#### **4.5.3 Pengambilan Organ Otak Kecil (Cerebellum) dan Serum**

##### **Darah**

Pembedahan tikus dilakukan sesuai kelompok perlakuan. Saat jantung tikus masih berdetak, diambil darah pada bagian jantung seluruhnya, selanjutnya darah dimasukkan dalam vacutainer dan dimiringkan agar terendapkan bagian padat serta terpisahkan bagian serum darah. Darah yang telah terendapkan disentrifugasi dan diambil bagian serum darah serta ditempatkan pada vacutainer lain untuk disimpan dalam freezer. Selanjutnya organ cerebellum diambil dan dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% selanjutnya dibagi dua. Satu bagian disimpan dalam larutan PBS Azida pada temperatur -20°C untuk analisa dengan metoda ELISA dan satu bagian disimpan dalam buffer formalin pada temperatur ruang untuk pembuatan preparat histopat.

#### **4.5.4 Pembuatan preparat histopat cerebellum**

##### **4.5.4.1 Embadding Cerebellum**

Organ cerebellum yang telah disimpan dalam buffer formalin, dicuci dan direndam dalam PFA 10% dilanjutkan dengan perendaman dalam etanol 70% selama 24 jam. Setelah 24, organ dipindahkan dan direndam dalam etanol 80% selama 2 jam, dalam etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit kemudian dalam etanol absolut selama 20 menit, perendaman dalam etanol diatas diulangi sebanyak 3 kali. Setelah sterilisasi dengan etanol selesai dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan xilol selama 20 menit diulangi sebanyak 2 kali. Kemudian organ dimasukkan ke dalam larutan xilol pada temperatur 60-63 °C selama 30 menit. Langkah terakhir organ cerebellum dicelupkan dalam parafin cair. Setelah beberapa saat parafin akan memadat sehingga cerebellum berada dalam blok parafin.

##### **4.5.4.2 Preparat Cerebellum**

Organ cerebellum yang telah di-*embadding* disiapkan pada penjepit mitokrom kemudian mata pisau mitokrom diatur agar sejajar dengan organ. Pada bagian pengaturan ketebalan irisan diatur terlebih dahulu pada 10 µm untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Setelah itu dilakukan pemotongan kembali dengan ukuran 5 µm. Irisan yang telah jadi diambil dengan kuas kemudian dicelupkan pada air suhu ruang. Selanjutnya irisan dipindahkan dalam air dengan temperatur 38-40 °C. Diantara irisan yang ada dipilih yang terentang sempurna dengan objek gelas kemudian dikeringkan diatas *hot plate* 38-40 °C. Preparat cerebellum yang telah siap disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C selama 6 hari untuk menghilangkan sisa parafin.

#### 4.5.5 Analisa Apoptosis Sel Menggunakan Metoda IHK

Preparat cerebellum yang telah disimpan dalam inkubator 38-40 °C selama 6 hari dicuci pada xilol bertingkat 1, 2, 3 masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya preparat cerebellum di-rehidrasi dengan cara direndam dalam etanol absolut bertingkat berurutan etanol 95%, 90%, 80%, dan 70 % masing-masing selama 5 menit agar bersih dari sisa-sisa parafin. Selanjutnya preparat dicuci PBS sebanyak 1x dan dikering annginkan 3 menit. Selanjutnya preparat ditetesi masing-masing 50µL dengan larutan Proteinase-K 1:50 (1µL Proteinase-K + 49 µL dH<sub>2</sub>O) kemudian diinkubasi suhu ruang 20 menit suhu ruang dalam wadah tertutup. Preparat ditetesi dengan PBS 1x selama 5 menit kemudian dibuang perlahan dan dilap daerah sekitar preparat (jangan sampai mengenai organ). Disiapkan larutan (30 µL 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 270 µL methanol) kemudian ditetaskan masing-masing organ 100 µL kemudian diinkubasi selama 5 menit suhu ruang. Larutan dibuang kemudian preparat dicuci dengan PBS 3x 5 menit kemudian daerah sekitar organ dilap. Selanjutnya ditetaskan @100 µL TdT Equilibration buffer dan diinkubasi suhu ruang (25°C) selama 30 menit, pada menit ke 25 larutan selanjutnya disiapkan yaitu 3 µL TdT Enzyme : 117 µL TdT Labelling Reaction Mix. Preparat ditetesi larutan tersebut @ 40 µL kemudian diinkubasi selama 90 menit pada temperatur 37°C. Tanpa dibuang larutan langsung ditetesi dengan stop buffer @ 100 µL kemudian inkubasi selama 5 menit 25°C. Larutan dibuang kemudian preparat dicuci dengan PBS 1 x 5 menit kemudian daerah sekitar organ dilap.

Selanjutnya ditambahkan @100 µL blocking buffer dan diinkubasi selama 10 menit 25°C pada menit ke 5 larutan konjugat disiapkan. Dicampurkan 4 µL 25X Konjugat + 96 µL Bloking buffer, untuk tiap-tiap organ ditetesi 100 µL larutan konjugat dan diinkubasi 30 menit suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS 1 x 5 menit serta daerah sekitar organ dikeringkan dengan tisu. Larutan DAB

dipersiapkan dengan cara mencampurkan 4  $\mu\text{L}$  DAB-1 + 116  $\mu\text{L}$  DAB -2 kemudian masing-masing organ ditetesi dengan 100  $\mu\text{L}$  larutan campuran DAB dan diinkubasi suhu ruang selama 15 menit. Preparat dicuci perlahan dengan aquades. Segera setelah itu, preparat ditetesi 100  $\mu\text{L}$  metil biru, diinkubasi pada temperatur ruang 1-3 menit kemudian diamati dengan mikroskop (tanpa menyentuh organ) apakah pewarnaan telah melekat. Setelah melekat dicuci dengan pristine mengalir sebanyak 3 kali dan diinkubasi dalam wadah tertutup suhu ruang semalaman. Esok hari slide dikeringkan dengan tisu pada daerah sekitar organ dan ditutup cover glass dengan bantuan larutan entellan. dan diinkubasi selama 24 jam 25°C.

#### **4.5.6 Analisa Caspase-3 Menggunakan Metoda IHK**

Preparat cerebellum yang telah disimpan dalam inkubator 38-40 °C selama 6 hari dicuci pada xilol bertingkat 1, 2, 3 masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya preparat cerebellum di-rehidrasi dengan cara direndam dalam etanol absolut bertingkat berurutan etanol 95%, 90%, 80%, dan 70 % masing-masing selama 5 menit agar bersih dari sisa-sisa parafin. Kemudian preparat disimpan dalam kulkas temperatur 4°C apabila belum dianalisa. Preparat cerebellum yang disimpan dalam kulkas 4°C dikering anginkan  $\pm 10$  menit terlebih dahulu agar embun-ambunnya menghilang. Selanjutnya dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Preparat ditetesi dengan Peroxidase blok dan diinkubasi suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan sekitar organ dengan tisu secara hati-hati agar tidak mengenai organ. Selanjutnya ditetesi antibody Caspase-3 @40 $\mu\text{L}$  dan diinkubasi dalam wadah tertutup suhu ruang selama semalaman  $\pm 20$  jam. Selanjutnya preparat dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan. Ditetesi masing-masing 1 tetes tiap organ dengan Antibodi sekunder dan diinkubasi suhu ruang selama 2 jam.

preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan antibody tersier dan diinkubasi suhu ruang selama 3,5 jam. Preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit dilanjutkan dengan pencucian dengan aquades 3 x 3 menit. Selanjutnya preparat ditetesi DAB @ 40  $\mu$ L inkubasi suhu ruang selama 30 menit. Preparat dicuci dengan pristine (aquades pH basa) 3 x 3 menit kemudian disimpan dalam wadah tertutup semalaman (preparat tidak boleh sampai kering, kelembapannya harus dijaga). Keesokan harinya preparat dikeringanginkan kemudian ditutup dengan glass cover menggunakan larutan entellan dan diinkubasi selama 24 jam suhu ruang. Preparat cerebellum untuk melihat ekspresi caspase-3 telah siap dianalisa dibawah mikroskop.

#### **4.5.7 Analisa AIF Menggunakan Metoda IHK**

Preparat cerebellum yang telah disimpan dalam inkubator 38-40 °C selama 6 hari dicuci pada xilol bertingkat 1, 2, 3 masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya preparat cerebellum di-rehidrasi dengan cara direndam dalam etanol absolut bertingkat berurutan etanol 95%, 90%, 80%, dan 70 % masing-masing selama 5 menit agar bersih dari sisa-sisa parafin. Kemudian preparat disimpan dalam kulkas temperatur 4°C apabila belum dianalisa.

Preparat cerebellum yang disimpan dalam kulkas 4°C dikering anginkan  $\pm$ 10 menit terlebih dahulu agar embun-ambunnya menghilang. Selanjutnya dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Preparat ditetesi dengan Peroxidase blok dan diinkubasi suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan sekitar organ dengan tisu secara hati-hati agar tidak mengenai organ. Selanjutnya ditetesi antibody AIF @ 40  $\mu$ L dan diinkubasi dalam wadah tertutup suhu ruang selama semalaman  $\pm$  20 jam. Selanjutnya preparat dicuci kembali dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan. Ditetesi masing-masing 1 tetes tiap organ dengan Antibodi sekunder dan diinkubasi suhu

ruang selama 2 jam. preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan antibody tersier dan diinkubasi suhu ruang selama 3,5 jam. Preparat dicuci dengan PBS 3 x 5 menit dilanjutkan dengan pencucian dengan aquades 3 x 3 menit. Selanjutnya preparat ditetesi DAB @ 40  $\mu$ L inkubasi suhu ruang selama 30 menit. Preparat dicuci dengan pristine (aquades pH basa) 3 x 3 menit kemudian disimpan dalam wadah tertutup semalaman (preparat tidak boleh sampai kering, kelembapannya harus dijaga). Keesokan harinya preparat dikeringanginkan kemudian ditutup dengan glass cover menggunakan larutan entellan dan diinkubasi selama 24 jam suhu ruang. Preparat cerebellum untuk melihat ekspresi AIF telah siap dianalisa dibawah mikroskop.

#### **4.5.8 Isolasi Protein dari Serum Darah**

Sample serum darah diukur volumenya kemudian ditambahkan dengan PBS:PMSF sebanyak 5 kali volume serum darah. Sample dalam mikrotube kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada temperatur 25°C. Supernatan ditambahkan dengan etanol 1:1 kemudian dikocok manual dan disimpan dalam lemari es temperatur  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C. Supernatan dibuang dan endapannya disimpan dalam lemari es temperatur  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  hingga seluruh etanol telah menguap  $\pm 3$  hari. Endapan yang terbentuk ditambahkan buffer tris-HCl 1:1.

#### **4.5.9 Analisa Profil Protein Serum Darah Dengan SDS-PAGE**

Larutan yang diperlukan dipersiapkan terlebih dahulu yaitu *separating gel* 12%, *stacking gel* 3%, dan *running buffer* pH 8,3. Mula-mula *separating gel* 12% dimasukkan dalam plat elektroforesis menggunakan mikropipet hingga garis hijau pertama pada cetakan yang tersedia kemudian ditunggu 5 menit hingga

memadat. Larutan *stacking gel* 3% ditambahkan diatas *separating gel* yang telah memadat hingga garis batas akhir plat elektroforesis. Setelah gel campuran siap, dipasang sisiran pembentuk sumuran sampel sebelum *stacking gel* memadat. Setelah *stacking gel* memadat dilepas sisirannya. Plat elektroforesis yang telah siap dipasang pada alat elektroforesis serta dituangi *running buffer* pH 8,3 secukupnya.

Sample serum darah yang telah diisolasi dimasukkan dalam tabung mikro serta ditambahkan dengan RSB (perbandingan volume 1:1). Kemudian larutan dipanaskan pada temperature 100°C selama 5 menit pada waterbath setelah itu didinginkan pada temperature ruang. Larutan yang telah dingin disuntikkan ke dalam 10 sumuran plat elektroforesis @ 30 µL. Masing-masing sumuran disuntikkan larutan dari serum darah yang berbeda-beda sesuai kebutuhan khusus sumuran yang pertama disuntikkan larutan standar. Setelah seluruh larutan siap pada tiap sumuran elektroforesis dilakukan dengan arus 28mA, 200 V hingga warna biru berada ±0,5cm dari batas bawah plat gel. Hasil *running* dikeluarkan dari plat elektroforesis kemudian direndam dalam larutan staining (pewarnaan) sambil *dishaker* selama 20 menit. Dilakukan *re-staining* dengan cara perendaman semalaman hingga pita dalam gel tampak jelas. Pita hasil elektroforesis yang telah tampak ditentukan harga  $R_f$  dan massa molekul relatif masing-masing pita dengan cara perbandingan dengan larutan standar.

#### **4.5.10 Analisa IC<sub>50</sub> Ekstrak Antosianin Menggunakan Metoda**

##### **DPPH**

Ekstrak antosianin dipreparasi terlebih dahulu dengan cara menambahkan pelarut acetonitrile dan natrium sulphate anhidrat hingga jenuh dilanjutkan dengan sentrifugasi 3500 rpm selama 10 menit, filtrat diambil dan ditambahkan dengan metanol dengan perbandingan 2:1. Kurva standar dibuat dengan larutan

standar Trolox dengan cara 50 mg Trolox diencerkan dalam metanol hingga 100 mL menggunakan labu ukur. Larutan stok dipipet sebanyak 0.4 mL ; 0.8 mL ; 1.2 mL ; 1.6 mL ; 2.0 mL diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan metanol. Masing-masing seri larutan untuk kurva standar dipipet sebanyak 2.5 mL kemudian dimasukkan tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0.05 mM. Larutan blanko dibuat dengan cara 1 mL DPPH 0.05 mM ditambah dengan 2.5 mL metanol. Dilakukan inkubasi selama 20 menit temperatur 37 °C kemudian segera diukur serapannya dengan UV-Vis pada 515 nm.

#### **4.5.11 Analisa Data**

Hasil data pengamatan yang telah didapatkan dianalisa menggunakan ANOVA one way dan uji Tukey dengan program IBM SPSS Statistics Version 23 untuk mengidentifikasi perbedaan antara kelompok perlakuan terhadap parameter yang diukur yaitu ekspresi apoptosis, caspase-3, dan AIF cerebelum yang dianalisa dengan metoda imunohistokimia (IHK). Kelompok perlakuan terdiri dari: kontrol negatif (KN); kontrol positif (K1) (oklusi 3 jam reperfusi 1 jam tanpa perlakuan) ; kontrol positif (K2) (oklusi 3 jam reperfusi 72 jam tanpa perlakuan) ; terapi antosianin (T1) (oklusi 3 jam reperfusi 24 jam dengan terapi) ; terapi antosianin (T2) (oklusi 3 jam reperfusi 72 jam dengan terapi).