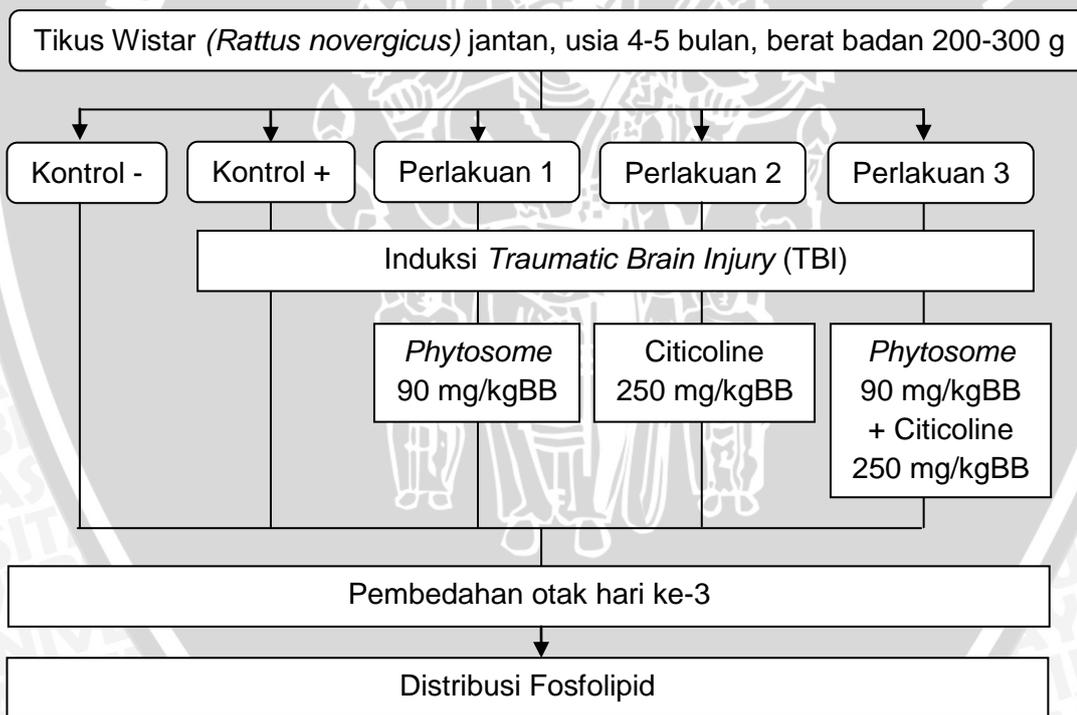


BAB IV  
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan desain eksperimen murni (*True Experimental Design*) di laboratorium secara *in vivo* dan menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Penelitian ini dilakukan dengan menguji pengaruh pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan terhadap peningkatan distribusi fosfolipid pada tikus model TBI. Adapun rancangan desain dari penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 4.1. Kerangka Rancangan Penelitian

Keterangan :

1. Kontrol negatif (n = 6) : tikus sehat tanpa diberikan perlakuan apapun.
2. Kontrol positif (n = 6) : tikus diinduksi TBI tanpa diberikan perlakuan.

3. Perlakuan 1 (n = 6) : tikus diinduksi TBI diberikan *phytosome* ekstrak pegagan (90mg/kgBB).
4. Perlakuan 2 (n = 6) : tikus diinduksi TBI dan diberikan Citicoline dosis 250 mg/kgBB.
5. Perlakuan 3 (n = 6) : tikus diinduksi TBI dan diberikan *phytosome* ekstrak pegagan + Citicoline.
6. Tikus pada kelompok kontrol maupun perlakuan dibedah H + 3 TBI.

#### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Menurut rumus *Federrer*, yaitu :

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

n = jumlah sampel tiap perlakuan

t = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini diketahui jumlah kelompok perlakuan (t) = 5 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan, sehingga didapat nilai n sebagai berikut.

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

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

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Berdasarkan rumus di atas, maka didapatkan jumlah sampel minimal tiap perlakuan pada penelitian ini adalah 5, dan dalam penelitian ini menggunakan 6 sampel tiap perlakuan. Sehingga, jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah 30 ekor tikus dengan menggunakan *simple random sampling*. Subjek penelitian yang digunakan adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan dengan usia antara 4 sampai 5 bulan, berat badan 200 – 300 gram.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan dan Citicoline. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah distribusi fosfolipid.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa laboratorium, seperti Laboratorium Fitoterapi dan Farmasetika Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) dan Laboratorium Farmokologi Universitas Muhammadiyah Malang untuk pelaksanaan formulasi *phytosome* ekstrak pegagan. Untuk pemeliharaan tikus dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi FKUB. Proses induksi TBI dan pembedahan tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia FKUB. Sementara, untuk pembuatan *slide* preparat otak tikus, pengecatan imunohistokimia dan penghitungan peningkatan distribusi fosfolipid dilaksanakan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 16 minggu terhitung mulai tanggal 16 Februari 2015 yang bertepatan dengan pengurusan kelengkapan berkas kelayakan etik di Komisi Etik Penelitian kesehatan FKUB. Penelitian ini berakhir pada bulan Juni 2015, yaitu periode analisis data dari hasil penelitian.

### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu alat untuk formulasi sediaan *phytosome* ekstrak Pegagan dan alat untuk

perlakuan hewan coba. Alat yang digunakan untuk formulasi sediaan *phytosome* ekstrak Pegagan adalah sebagai berikut :

1. Alat untuk ekstraksi Pegagan, yaitu : tisu, neraca analitik, toples kaca, aluminium foil, plastik wrap, kain flanel, batang pengaduk, sendok *stainless*, corong, neraca analitik, sudip, cawan petri, sendok tanduk, dan loyang.
2. Alat untuk mengaduk simplisia dengan etanol serta pembuatan *phytosome*, yaitu : *overhead stirrer*.
3. Alat untuk menghilangkan pelarut pada maserat, yaitu : *rotary evaporator* dan *vacum drying*.
4. Alat untuk menghomogenkan ekstrak dengan lesitin, yaitu : *magnetic stirrer*.
5. Alat untuk filtrasi sediaan ekstrak Pegagan dan *phytosome* ekstrak Pegagan, yaitu : mikrofilter berukuran 0,2 – 0,4  $\mu\text{m}$ .
6. Alat untuk karakterisasi ekstrak dengan metode KLT, yaitu pipet tetes, gelas *beaker*, gelas ukur, *chamber glass*, mortir kecil, kertas saring, plat *silica gel* 3 cm x 10 cm sebagai lempeng KLT, pensil, penggaris, cawan petri, pinset, *oven*, dan *hot plate*.
7. Alat untuk karakterisasi ekstrak dengan metode LC/MS-MS, yaitu : timbangan, pipet volume, bola hisap, pipet tetes, *beaker glass*, mikropipet 0,1 – 10  $\mu\text{L}$ , mikropipet 20 – 200  $\mu\text{L}$ , dan mikropipet 100 – 1000  $\mu\text{L}$ .
8. Alat untuk karakterisasi ekstrak dengan metode TEM, yaitu : timbangan, pipet volume, bola hisap, pipet tetes, *beaker glass*, mikropipet, cawan petri, dan batang pengaduk.

Sedangkan alat yang digunakan untuk perlakuan pada hewan coba adalah sebagai berikut :

1. Alat untuk perawatan tikus, yaitu : kandang tikus berukuran 50 x 30 x 20 cm dengan penutup kandang, baskom, botol minum, dan tempat makan tikus, serta timbangan untuk menimbang bahan pakan dan berat badan tikus.
2. Alat untuk persiapan induksi TBI dan perawatan pasca induksi TBI, yaitu : peralatan bedah berupa kassa, pinset, gunting, *needle holder*, dan *catgut*.
3. Alat untuk induksi TBI, yaitu : alat fiksator dengan ukuran tinggi lintasan beban 150 cm, statif penjepit, selongsong silinder beban seberat 40 gram untuk dijatuhkan, gabus dengan ukuran 20 x 20 x 2 cm sebagai alas hewan coba, meja operasi, dan *paper clip* untuk fiksasi tikus pada saat induksi.
4. Alat untuk injeksi anestesi, *phytosome* ekstrak Pegagan, dan Citicoline, yaitu : spuit 1 cc dan 3 cc.
5. Alat untuk pengambilan otak tikus, yaitu : toples, kapas, gunting bedah, alas, jarum pentul, dan botol organ.
6. Alat untuk pembuatan slide preparat otak dan pengecatan imunohistokimia, yaitu : inkubator, *slide glass*, *cover glass*, mikrotom, pinset, wadah slide 1 buah, *tray* 1 buah, mikropipet, dan *automatic processing*.
7. Alat untuk pengukuran peningkatan distribusi fosfolipid, yaitu mikroskop cahaya dan *scanning*.

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu bahan untuk formulasi sediaan *phytosome* dan bahan untuk perlakuan hewan coba. Bahan yang digunakan untuk formulasi sediaan *phytosome* adalah *handscoon*, masker, serbuk simplisia kering Pegagan, etanol 70%, aquades, kain flanel, ekstrak kental Pegagan, lesitin soya, aqua bebas CO<sub>2</sub>, dan pelarut DMSO. Bahan untuk karakterisasi ekstrak Pegagan menggunakan metode KLT adalah ekstrak kental herba Pegagan, metanol, fase gerak (kloroform : asam asetat glasial : metanol : air [60 : 32 : 12 : 8]), dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (dari campuran reaksi anisaldehyd 0,5 mL, asam asetat glasial 10 mL, metanol 85 mL, dan asam sulfur 5 mL). Bahan untuk karakterisasi ekstrak Pegagan menggunakan metode LC/MS-MS adalah larutan standar asiatikosida, metanol, aquades, dan ekstrak kental herba Pegagan. Sementara, bahan untuk karakterisasi *phytosome* ekstrak pegagan menggunakan metode TEM adalah ekstrak kental herba Pegagan, aquades, karbon yang terlapsi tembaga, dan *uranic acid* 2%.

Sedangkan bahan yang digunakan untuk perlakuan hewan coba adalah tikus *Rattus novergicus* jantan usia antara 4 sampai 5 bulan dengan berat badan 200 – 300 gram, pakan normal tikus (terdiri dari pars, tepung, dan air), air minum tikus, *phytosome* ekstrak pegagan, dan Citicoline. Bahan untuk induksi TBI dan perawatan pasca TBI adalah xylazin 10 mg/kgBB IM, ketamin 100 mg/kgBB IM, alkohol 70%, *alcohol swab*, kapas, povidon iodine 10% 50cc, salep gentamisin, *handscoon*, dan masker. Bahan untuk euthanasia dan pengambilan otak tikus adalah eter, formalin 10%, dan alkohol. Bahan untuk pembuatan slide preparat otak tikus adalah xylol, ethanol 100%, PBS pH 7,4, IHK Kit, dan tisu.

## 4.6 Definisi Operasional

### 4.6.1 *Phytosome* Ekstrak Pegagan

*Phytosome* adalah pengembangan teknologi farmasetika yang menggabungkan ekstrak tanaman atau fitokonstituen larut air ke dalam fosfolipid untuk menghasilkan molekul yang larut dalam lipid (Kareparamban *et al.*, 2012). Simplisia herba Pegagan yang digunakan didapat dari UPT Materia Medica, Batu Malang. Hasil ekstraksi dikarakterisasi dengan metode KLT dan LC/MS-MS. Ekstrak Pegagan selanjutnya diformulasikan dengan fosfatidilkolin untuk membentuk kompleks lipid *phytosome* sesuai dengan prosedur penelitian. Hasil *phytosome* ekstrak Pegagan dikarakterisasi dengan metode TEM. Penelitian ini menggunakan dosis *phytosome* ekstrak Pegagan sebesar 90 mg/KgBB.

### 4.6.2 Distribusi Fosfolipid

Fosfolipid adalah struktur membran sel, berperan pada transportasi intrasel dan neurotransmisi di otak (Tayebati dan Amenta, 2013). Pengukuran distribusi fosfolipid dilakukan menggunakan *software scan dot slide Olivya* yang berada di laboratorium Patologi Anatomi FKUB. Identifikasi distribusi fosfolipid pada area trauma pasca TBI ditandai dengan penampakan sel saraf utuh berinti.

### 4.6.3 Citicoline

Citicoline merupakan terapi yang umum digunakan sebagai neuroprotektor dengan mencegah aktivasi *phospholipase A2* dan *cardiolipin*, dan pemasok fosfatidilkolin sebagai bahan baku untuk biosintesis fosfolipid membran sel (Grieb, 2014; Menku *et al.*, 2014). Penelitian ini menggunakan dosis Citicoline sebesar 250 mg/KgBB.

#### 4.6.4 Tikus Model TBI

Tikus yang digunakan pada perlakuan penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* usia 4 – 5 bulan dengan berat 250 – 300 gram yang diperoleh dari toko hewan lokal. Parameter TBI ditandai dengan terbentuknya hematoma dan jejas pada tengkorak tikus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Pembuatan Surat Keterangan Laiak Etik

Pengurusan etik penelitian ini dilakukan dengan mengajukan proposal beserta seluruh syarat yang diperlukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang kemudian akan dievaluasi kelayakannya.

##### 4.7.2 Perawatan Tikus

Tikus ditimbang dan diaklimatisasi selama 1 minggu di dalam kandang (50 x 30 x 20 cm) yang diisi dengan 3 ekor tikus untuk masing masing kandang. Dalam tiap kandang, tikus diperlakukan dalam lingkungan sekam padi kering yang diganti secara berkala tiap dua hari sekali. Tikus diberi makan (diet normal) dan minum 1 kali sehari. Komposisi pakan terdiri dari pars dan tepung dengan perbandingan 1 : 3. Pembuatan pakan dilakukan dengan mencampur pars dan tepung dengan air secukupnya dan mengaduk campuran tersebut hingga membentuk adonan yang kalis, lalu membentuknya menjadi bulatan-bulatan yang selanjutnya ditimbang masing-masing 30 gram.

##### 4.7.2.1 Pemberian Pakan Tikus

Pemberian pakan tikus dilakukan setiap hari. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut.

1. Menggunakan masker dan sarung tangan.
2. Ditimbang pars sebanyak  $20 \pm 1$  gram @ tikus dalam wadah kering.
3. Diukur air minum q.s., dituang ke dalam wadah berisi pars sampai pars lembek.
4. Ditimbang tepung sebanyak  $10 \pm 1$  gram @ tikus, dimasukkan ke dalam wadah berisi pars.
5. Dicampur adonan hingga homogen.
6. Adonan ditimbang  $30 \pm 1$  gram untuk masing-masing tikus.
7. Dicatat berat masing – masing pakan untuk tiap kandang.
8. Pakan tikus dimasukkan ke dalam tempat makan.

#### 4.7.2.2 Pembersihan Kandang Tikus

Pembersihan kandang tikus dilakukan tiap dua hari sekali. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut.

1. Menggunakan masker dan sarung tangan.
2. Disiapkan serok / sekup dan kantong plastik
3. Dibuka penutup kandang tikus
4. Diletakkan tikus ke dalam wadah lain
5. Dibersihkan sekam kotor ke dalam kantong plastik
6. Diganti sekam bersih secukupnya ke dalam kandang tikus
7. Dimasukkan tikus ke dalam kandang

#### 4.7.2.2 Penimbangan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan tikus dilakukan satu hari sebelum dilakukan perlakuan. Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut.

1. Menggunakan masker dan sarung tangan.

2. Disiapkan timbangan analitik dan wadah tikus.
3. Dinolkan timbangan menggunakan wadah tikus berupa wadah silinder.
4. Diambil tikus dan dimasukkan ke dalam wadah.
5. Dicatat berat badan tikus.

#### 4.7.3 Ekstraksi Pegagan

Pembuatan ekstrak Pegagan pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi dengan cara merendam simplisia ke dalam larutan penyari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Simplisia herba Pegagan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari UPT Materia Medika, Batu Malang yang sudah tersertifikasi.

Prosedur maserasi simplisia Pegagan pada penelitian ini dimulai dengan setiap 4 kg simplisia ditambahkan 20 liter etanol 70%, dicampur dalam maserator (toples kaca), diaduk pelan dengan stirer kecepatan 70 – 500 rpm selama 30 menit pada awal perendaman, ditutup rapat menggunakan aluminium foil. Campuran dalam maserator disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan pengadukan lalu dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dengan corong dan kain flanel, lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* (tiap 300 mL hasil maserasi diuapkan kurang lebih 3 jam atau sampai tidak menetes lagi pelarutnya dengan suhu 40°C dan kecepatan 30 rpm) dan *divacum drying* untuk menghilangkan kadar air (suhu 40°C, selama 1,5 jam).

Selanjutnya dilakukan tahapan karakterisasi terhadap ekstrak kental Pegagan dengan melakukan uji kualitatif menggunakan metode KLT dan uji kuantitatif kandungan asiatikosida dengan menggunakan metode LC MS-MS (George *et al.*, 2009; Pramono dan Ajiastuti, 2004).

#### 4.7.4 Uji Kualitatif Asiatikosida pada Ekstrak Pegagan

Uji kualitatif dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dimana pada uji ini digunakan standard pembanding, yaitu standard asiatikosida sehingga Rf yang nanti dihasilkan akan dibandingkan. Prosedur uji kualitatif yang dilakukan meliputi preparasi sampel, preparasi fase gerak, dan penotolan sampel hingga evaluasi hasil (Zulkarnaen, 2014; Sulistiyani, 2014; Wagner, 1996).

##### 4.7.4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan ditimbang ekstrak kental herba Pegagan sebanyak 20 mg. Kemudian dilarutkan dalam 3 mL metanol. Hasilnya adalah ekstrak yang siap diuji KLT (Zulkarnaen, 2014; Sulistiyani, 2014; Wagner, 1996).

##### 4.7.4.2 Preparasi Fase Gerak

1. Disiapkan kloroform : asam asetat glasial : metanol : air (60 : 32 : 12 : 8), kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditutup.
2. Kertas saring yang berukuran 2 x 10 cm dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup.
3. Kertas saring dibiarkan sampai terbasahi sempurna (jenuh).
4. Fase gerak siap digunakan untuk uji KLT.

##### 4.7.4.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis

1. Larutan sampel ditotolkan pada plat KLT berukuran 2 x 10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total).
2. Larutan standard ditotolkan pada plat KLT berukuran 2 x 10 cm sebanyak 0,5  $\mu$ L (5 total), bersebelahan dengan larutan sampel.

3. Plat KLT dimasukkan dalam *chamber* dan ditutup.
4. Fase gerak dibiarkan naik sampai 1 cm dari tanda batas atas.
5. Plat KLT diambil dari *chamber* dan dikering-anginkan.
6. Disemprot dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat (anisaldehid 0,5 mL, asam asetat glasial 10 mL, metanol 85 mL, dan asam sulfur 5 mL).
7. Dipanaskan pada *hot plate* (110°C) selama 7 – 10 menit.
8. Diamati pada sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm.
9. Diamati perubahan warnanya (positif asiaticosida berwarna merah-ungu).
10. Noda yang terbentuk dihitung nilai Rf-nya, nilai Rf asiaticosida = 0,2 – 0,35.

#### 4.7.5 Uji Kuantitatif Asiatikosida pada Ekstrak Pegagan

Uji kuantitatif asiaticosida pada *phytosome* dilakukan dengan menggunakan LC MS-MS. Dimana dalam penentuan kadar asiaticosida ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu pembuatan kurva baku untuk mendapatkan persamaan kurva baku yang akan digunakan dalam perhitungan kadar. Kemudian dilakukan penginjekan sampel hingga didapatkan *peak area* yang menggambarkan konsentrasi asiaticosida dalam ekstrak pegagan (Zulkarnaen, 2014).

##### 4.7.5.1 Preparasi Instrumen

###### 4.7.5.1.1 Preparasi Instrumen LC-MS/MS

1. Dipersiapkan dengan *purgig* terhadap kolom LC guna menghilangkan sisa-sisa eluen yang masih terdapat pada kolom.

2. Dilakukan *pumping* terhadap eluen atau fase gerak selama kurang lebih 5 menit.
3. Dilakukan *aqualibrate* selama 5 menit dengan tujuan untuk menstabilkan kolom.
4. Sistem LC siap digunakan untuk analisis.

#### 4.7.5.1.2 Optimasi Kondisi Kromatografi

Kondisi kromatografi diatur dengan cara memvariasikan beberapa parameter untuk memisahkan senyawa asiatikosida dari senyawa yang lainnya. Adapun parameter tersebut antara lain adalah komposisi serta laju alir fase gerak yang digunakan. Kondisi optimum kromatografi yang terpilih merupakan kondisi yang dapat menghasilkan pemisahan analit dengan baik pada waktu retensi yang relatif singkat.

#### 4.7.5.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel pada pembuatan kurva baku dilakukan dengan cara 0,05 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 mL metanol. Larutan yang terbentuk disaring menggunakan *syringe filter* 0,2  $\mu\text{m}$  *polytetrafluoroethylene* (PTFE). Filtrat yang diperoleh digunakan untuk analisis LC/MS-MS (Zulkarnaen, 2014).

#### 4.7.5.3 Prosedur Validasi

##### 4.7.5.3.1 Pembuatan Larutan Baku Induk 100 ppm

1. Menimbang larutan standar asiatikosida 1 mg, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL.
2. Menambahkan metanol sebanyak 5 mL dalam labu ukur 100 mL.
3. Campuran no.1 dan 2 dikocok untuk melarutkan campuran tersebut.
4. Ditambahkan metanol dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

#### 4.7.5.3.2 Pembuatan Larutan Baku Kerja (dalam Berbagai Konsentrasi)

1. Larutan baku kerja 4000 ppb  
Dipipet 0,2 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
2. Larutan baku kerja 2000 ppb  
Dipipet 0,1 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
3. Larutan baku kerja 1000 ppb  
Dipipet 0,05 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
4. Larutan baku kerja 800 ppb  
Dipipet 0,04 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
5. Larutan baku kerja 750 ppb  
Dipipet 0,0375 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
6. Larutan baku kerja 600 ppb  
Dipipet 0,03 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
7. Larutan baku kerja 500 ppb  
Dipipet 0,025 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.
8. Larutan baku kerja 400 ppb  
Dipipet 0,02 mL larutan baku induk 100 ppm ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas.

#### 4.7.5.4 Linearitas

Untuk membuat kurva linearitas, larutan baku kerja (1000 ppb, 750 ppb, dan 500 ppb) diukur konsentrasinya dengan pengulangan sebanyak 5 kali hingga diperoleh persamaan garis  $R^2 > 0,996$ .

#### 4.7.5.5 Akurasi

Dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku atau *spiking*. Larutan standar asiatikosida dengan konsentrasi 1000 ppb, 750 ppb, dan 500 ppb ditambahkan ke dalam ekstrak Pegagan. Kemudian diukur dengan 3 kali pengulangan tiap konsentrasi. Selanjutnya dihitung % perolehan kembali (% *recovery*). Berikutnya dapat dianalisa kembali kadarnya.

#### 4.7.5.6 Presisi

Dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku atau *spiking*. Larutan standar asiatikosida dengan konsentrasi 1000 ppb, 750 ppb, dan 500 ppb ditambahkan ke dalam ekstrak Pegagan. Kemudian diukur dengan 3 kali pengulangan tiap konsentrasi. Selanjutnya dihitung % koefisien variasi (% KV).

#### 4.7.5.7 Selektifitas

Dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku atau *spiking*. Larutan standar asiatikosida dengan konsentrasi 1000 ppb, 750 ppb, dan 500 ppb ditambahkan ke dalam ekstrak Pegagan. Kemudian diukur dengan 3 kali pengulangan tiap konsentrasi. Berikutnya dilihat kemampuan alat untuk memisahkan senyawa pada *retention time* yang hampir sama.

#### 4.7.5.8 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi

1. Diukur berdasarkan kurva baku linearitas.

2. Ditentukan konsentrasi terkecil dimana asiatikosida masih dapat terdeteksi dengan baik oleh instrumen dan masih dapat membersihkan respon seksama.
3. LOD dihitung dengan rumus  $3 \times$  simpangan baku / slope.
4. LOQ dihitung dengan rumus  $10 \times$  simpangan baku / slope.

#### 4.7.5.9 Analisis Data

Data analisis secara deskriptif dalam bentuk narasi, tabel atau grafik.

#### 4.7.6 Pembuatan *Phytosome* Ekstrak Pegagan

Metode yang digunakan dalam pembuatan *phytosome* adalah metode sonikasi. Metode sonikasi adalah pencampuran ekstrak Pegagan dengan etanol 70% dan lesitin (fosfatidilkolin).

Proses pembuatan *phytosome* pada penelitian ini dilakukan dengan mencampur 15 gram lesitin dengan etanol 70% (perbandingan 1 : 1). Hasil campuran ini diaduk dengan *magnetic stirrer* 1300 rpm selama 30 menit pada suhu 40°C. Kemudian, dari hasil campuran ekstrak, fosfolipid, dan *solven* tersebut diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*, lalu dipindahkan ke dalam gelas *beaker* dan ditimbang bobotnya. Hasilnya dihidrasi menggunakan air bebas CO<sub>2</sub> sebanyak 30 mL (1 : 2). Selanjutnya, hasil *phytosome* ekstrak pegagan dikarakterisasi secara kualitatif untuk melihat bentuk partikel dan secara kuantitatif untuk melihat ukuran partikel dengan menggunakan TEM (Acharya dan Parihar, 2011; Kareparamban *et al*, 2012). Tahap berikutnya, *phytosome* ekstrak Pegagan difiltrasi menggunakan mikrofilter berukuran 0,2 – 0,4 µm. Hasil filtrasi inilah yang selanjutnya akan diinjeksi secara intramuskular pada tikus model TBI.

#### 4.7.7 Uji Kualitatif dan Kuantitatif *Phytosome* Ekstrak Pegagan

Uji kualitatif dan kuantitatif *phytosome* ekstrak pegagan digunakan untuk melihat bentuk dan ukuran partikel. Uji ini dilakukan dengan menggunakan TEM. Tahap dari sampel *phytosome* ekstrak didispersikan ke dalam air dan diletakkan di atas karbon yang terlapsi tembaga untuk membentuk lapis film tipis. Lapisan film ini kemudian diwarnai dengan *uranic acid* 2% dan ditunggu hingga kering dengan pengeringan udara. Film akan tampak seperti noda dengan pengamatan pada *Transmission Electron Microscope* JEOL (JEM 2100) (Das and Kalita, 2014).

#### 4.7.8 Induksi *Traumatic Brain Injury* (TBI)

Induksi TBI pada penelitian ini dilakukan dengan model penjatuhan beban *Feeney*. Beban dijatuhkan secara bebas dari ketinggian 180 cm di atas kepala tikus yang kulitnya terbuka. Adapun prosedur induksi TBI adalah sebagai berikut (Albert-Weissenberger dan Siren, 2010).

1. Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan dalam keadaan bersih (disterilkan dengan derendam pada alkohol 25%) dan siap pakai.
2. Digunakan masker dan *handscoon* selama induksi.
3. Ditimbang berat badan tikus.
4. Setelah persiapan selesai, tikus dianestesi dengan menggunakan terapi anestesi kombinasi ketamin (dosis 100 mg/kgBB) dan xylazin (dosis 10 mg/kgBB) secara intramuskular pada otot paha.
5. Setelah tikus teranestesi sempurna, dibaringkan tikus di atas alas gabus dengan posisi telungkup, kemudian difiksasi keempat ekstremitas tikus dengan menggunakan *papper clip*.

6. Kemudian kepala tikus didisinfeksi menggunakan alkohol 70% dan dicukur bulu kepalanya pada bagian yang akan dijatuhi beban (pada bagian tengah kepala).
7. Dibedah kulit kepala tikus yang bulunya telah dicukur.
8. Diposisikan kepala tikus yang telah dicukur berada di bawah lintasan silinder beban agar beban jatuh tepat di atas tulang kepala tikus dan diberi jarak 1 cm untuk menjaga kompresi udara.
9. Dijatuhkan silinder beban seberat 40 gram (diameter 4 mm) pada lintasan silinder setinggi 1,5 m. Silinder beban dijatuhkan menggunakan penjepit untuk menghindari adanya dorongan mekanis.
10. Setelah beban dijatuhkan sempurna dengan posisi tegak lurus, dibersihkan kulit kepalatikus, dan dijahit kembali kulit kepala tikus. Kemudian diberikan salep gentamicin 10% secara topikal.
11. Setelah selesai, dicuci kembali alat-alat yang telah digunakan.
12. Sepuluh menit kemudian, mulai dilakukan uji aktivitas farmakologis pada masing-masing kelompok perlakuan dengan pemberian *phytosome* ekstrak Pegagan pada kelompok perlakuan 1, Citicoline pada kelompok perlakuan 3, dan gabungan *phytosome* ekstrak Pegagan serta Citicoline pada kelompok perlakuan 3 melalui injeksi intraperitoneum.
13. Tikus yang telah diberikan perlakuan, diletakkan di dalam kandang dengan sekam padi kering bersih dan diberikan perlakuan injeksi yang sama setiap hari, serta dilakukan monitoring secara berkala. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada hari ke-3 untuk melihat peningkatan distribusi fosfolipid dengan pengecatan imunohistokimia.

#### 4.7.9 Prosedur Pemberian *Phytosome* Ekstrak Pegagan dan Citicoline

*Phytosome* ekstrak Pegagan pertama kali diberikan pada 10 menit pasca induksi TBI. Kelompok perlakuan 1 diberikan *phytosome* ekstrak Pegagan dengan dosis 90 mg/KgBB. Kelompok perlakuan 2 diberikan Citicoline dengan dosis 250 mg/KgBB. Sedangkan kelompok perlakuan 3 diberikan kombinasi *phytosome* ekstrak Pegagan 90 mg/KgBB dan Citicoline 250 mg/KgBB. Pemberian perlakuan dilakukan dengan injeksi intraperitoneal (i.p.) pada abdomen tikus yang sudah didisinfeksi menggunakan *alcohol swab*. Selanjutnya, *phytosome* ekstrak Pegagan dan Citicoline diinjeksikan sebanyak satu kali sehari sesuai selama 3 hari. Dan dilakukan pembedahan pada hari ke-3 untuk melihat peningkatan distribusi fosfolipid dengan pengecatan imunohistokimia.

#### 4.7.10 Pembedahan untuk Pengambilan Otak Tikus

Selang 3 hari pasca trauma TBI dilakukan pengambilan sampel otak tikus dengan prosedur sebagai berikut :

1. Tikus dieuthanasia menggunakan eter.
2. Setelah tikus tidak berespon, tikus diletakkan pada papan bedah.
3. Dilakukan pemotongan leher belakang tikus seperlunya atau dipotong searah punggung ke perut seluruhnya sehingga bisa terlihat batas dari tengkorak kepala dan kulit.
4. Kulit kepala tikus di daerah lesi TBI dibuang seutuhnya.
5. Tengkorak dibuka dengan kekuatan jari hingga terbuka dan didapatkan penampang otak dan batas-batasnya.
6. Secara perlahan, dilakukan pemotongan saraf yang masih terhubung ke otak.

7. Dengan hati-hati otak dikeluarkan dan diletakkan dalam botol organ berisi larutan formalin 10%.
8. Selanjutnya masing-masing sampel otak tikus akan dijadikan slide preparat dan dilakukan pewarnaan imunohistokimia.

#### 4.7.11 Pembuatan Slide Preparat Histopatologi Jaringan

Pembuatan preparat histopatologi melalui berbagai proses sebagai berikut.

1. Pemotongan jaringan otak dengan ukuran panjang 2 cm, lebar 1 cm, dan tebal 3 mm.
2. Setelah itu, dilakukan fiksasi jaringan otak menggunakan formalin 10% direndam selama 18 - 24 jam.
3. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dilanjutkan dengan dilakukannya tahap dehidrasi menggunakan larutan aseton selama 1 jam sebanyak 4 kali.
4. Setelah itu, dilakukan tahap pembersihan (*clearing*) dengan larutan xylol selama 30 menit sebanyak 4 kali.
5. Berikutnya dilakukan tahap pembersihan (*impregnation*) menggunakan parafin cair dengan suhu 55°C selama 1 jam 4 kali, kemudian dilakukan pengecoran (*blocking*) pada parafin blok.
6. Selanjutnya, dilakukan sayatan pada jaringan yang sudah tertanam dalam parafin blok menggunakan mikrotom *rotary* dengan ketebalan 3 – 5 mikron kemudian diletakkan pada objek *glass*.

#### 4.7.12 Pemeriksaan Distribusi Fosfolipid

Pemeriksaan distribusi fosfolipid dilakukan dengan metode pengecatan imunohistokimia. Langkah-langkah imunohistokimia (IHK) adalah sebagai berikut (Fatmawati *et al.*, 2010).

1. Sampel yang telah diblok parafin di-deparafinisasi lalu disimpan selama 24 jam dan dilakukan pengecatan IHK.
2. Sampel dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 2 x 5 menit. Ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai *blocker endogenous H<sub>2</sub>-ase* sebanyak 1 tetes tiap organ dan diamkan selama 30 menit.
3. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 x 5 menit. Dilakukan *blocking* protein dengan ditetesi serum 1% dan diamkan selama 20 menit.
4. Dicuci dengan PBS pH 7,4 3 x 5 menit. Diinkubasi dengan ditetesi antibodi primer dalam serum 1 : 500 dan ditunggu selama 2 jam pada suhu ruang, masing-masing organ ditetesi sebanyak 50 µL.
5. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 x 5 menit. Diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti dari antibodi primer) dengan ditetesi antibodi sekunder dalam serum 1 : 500 dan ditunggu selama 1 jam pada suhu ruang, masing-masing organ ditetesi sebanyak 1 tetes.
6. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3x5 menit, lalu ditetesi polimer dan ditunggu selama 40 menit.
7. Dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2 x 5 menit. Dicuci dengan aquades sebanyak satu kali.
8. Ditetesi dengan larutan *diamono benzidine* (DAB) dan dibiarkan selama 20 menit. Dicuci dengan aquades. Ditetesi dengan *mayer hematoxilen* dan ditunggu selama 5 menit.

9. Ditambahkan aquades (di atas *slide*), didiamkan selama 10 menit. Dicuci dengan aquades mengalir. Dikeringkan dengan kering angin pada suhu ruang selama  $\pm 3$  jam.
10. Ditetesi dengan entelan. Terakhir ditutup dengan *cover glass*.
11. Kemudian dilakukan pemeriksaan fosfolipid dengan perbesaran lensa 40 kali obyektif dan 10 lapang pandang pada tiap *slide*.

Pengukuran distribusi fosfolipid dilakukan dengan melakukan pengamatan slide preparat otak tikus. Slide preparat otak tikus dipindai menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Kemudian diamati dan diukur distribusi fosfolipid menggunakan perangkat lunak *Scan Dot Slide Slide Olyvia* pada komputer. Pengukuran distribusi fosfolipid dilakukan pada 10 lapang pandang dan dikerjakan oleh dua orang pemeriksa.

#### 4.8 Analisis Data

Hasil penghitungan peningkatan ekspresi distribusi fosfolipid dari imunohistokimia dianalisa dengan IBM SPSS (*Statistical Product Service Solution*) versi 20. Analisa ini dilakukan dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Proses analisis data diawali dengan menguji normalitas dan homogenitas data. Jika hasil uji homogenitas didapatkan varian data yang homogen, maka selanjutnya dapat dilakukan uji hipotesis komparatif dan korelatif. Uji komparatif yang dilakukan adalah uji *One-way ANOVA*. Jika didapatkan varian data yang tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*. Terakhir, dilakukan uji *Post hoc test* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan signifikan. Sedangkan untuk uji korelatif, dilakukan menggunakan uji *Pearson* (Dahlan, 2004).

4.9 Jadwal Penelitian

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Tahap Persiapan</b>																	
1.	Pengurusan <i>ethical clearance</i>																
2.	Pengurusan perijinan laboratorium																
3.	Persiapan alat dan bahan penelitian																
<b>Tahap Pelaksanaan</b>																	
1.	Aklimatisasi tikus																
2.	Ekstraksi Pegagan																
3.	Karakterisasi ekstrak Pegagan																
4.	Pembuatan <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan																
5.	Karakterisasi <i>phytosome</i> ekstrak Pegagan																
6.	Induksi TBI																

