

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan September 2016 – Februari 2017 di Institut Biosains Universitas Brawijaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) usia 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram yang didapatkan dari Institut Biosains Universitas Brawijaya. Hewan coba diadaptasikan selama seminggu dalam kandang dengan suhu dan kelembaban yang telah ditentukan dan diberi pakan serta air minum secara teratur. Jumlah hewan coba yang digunakan dihitung berdasarkan rumus berikut :

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$5n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

t = jumlah kelompok uji

n = jumlah tikus yang diperlukan tiap kelompok uji

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah total hewan coba yang dibutuhkan untuk melakukan studi terhadap terapi antosianin ubi jalar ungu pada hewan model stroke iskemik sebanyak 20 ekor. Seluruh hewan coba yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok untuk masing-masing variable yang telah ditentukan sehingga setiap kelompok terdiri dari 4 hewan coba.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah :

1. Pengkondisian dan preparasi hewan coba
2. Pembedahan MCAO dan Reperfusi
3. Terapi menggunakan ekstrak antosianin ubi jalar ungu
4. Pembedahan akhir dan pengambilan otak kecil
5. Pembuatan preparat otak kecil
6. Analisis ekspresi β -Amyloid protein otak kecil
7. Analisis ekspresi VEGF otak kecil
8. Analisis kadar BDNF otak kecil
9. Analisa hasil data pengamatan secara kuantitatif dan deskriptif

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas: Perlakuan oklusi secara MCAO selama 3 jam yang dilanjutkan dengan reperfusi dan terapi menggunakan ekstrak antosianin ubi jalar ungu.

Variabel terikat: Ekspresi β -Amyloid, ekspresi VEGF dan kadar BDNF otak kecil.

Variabel kontrol: Usia, berat badan, jenis kelamin, jenis hewan coba dan kondisi eksperimental di lapangan

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Analisis Antosianin Ubi Jalar Ungu Menggunakan LC-MS

Senyawa antosianin yang terkandung di dalam produk minuman ubi jalar ungu dipisahkan untuk selanjutnya diidentifikasi struktur antosianin di dalamnya. Struktur antosianin yang didapatkan dari LC-MS ditentukan berdasarkan berat molekul dari setiap senyawa yang berhasil dideteksi yang dibandingkan dengan referensi. Proses optimasi analisis dilakukan dengan menggunakan konsentrasi sebesar 1,9 μ M dan fase gerak 0,1 μ L asam formit dalam aquabidest (A) serta asam formit dalam aseton nitril (B), yang diikuti dengan injeksi menggunakan metode polarisasi positif.

4.5.2 Persiapan Hewan coba

Hewan coba yang digunakan merupakan tikus jantan jenis *Rattus norvegicus* strain Wistar yang berusia 2-3 bulan. Kisaran berat badan yang digunakan sebesar 200-300 gram. Hewan yang akan diuji diadaptasikan selama seminggu sebelum dilakukan perlakuan. Hewan tersebut ditempatkan dalam kandang dengan suhu dan kelembaban yang telah ditentukan dan diberi pakan serta air minum secara teratur.

4.5.3 Pembagian Hewan Coba

Dalam penelitian ini hewan coba dibagi menjadi lima kelompok yang dilabeli KN, K1, K2, T1 dan T2. Masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor hewan coba. Kelompok pertama (KN) merupakan kontrol negatif yaitu tikus yang tidak mendapatkan perlakuan MCAO dengan kondisi badan yang sehat. Kelompok kedua (K1) merupakan kelompok hewan yang mendapat perlakuan MCAO. Setelah 1 jam stroke iskemik, hewan didekapitasi. Kelompok ketiga (K2) adalah kelompok hewan yang mendapatkan perlakuan MCAO yang dibiarkan selama 72 jam tanpa perlakuan. Kelompok keempat (T1) adalah kelompok hewan yang mendapatkan perlakuan MCAO yang diberi terapi antosianin ubi jalar ungu selama 24 jam. Kelompok kelima (T2) adalah kelompok hewan yang mendapatkan perlakuan MCAO yang diberi terapi antosianin ubi jalar ungu selama 72 jam. Antosianin ubi jalar ungu diberikan setiap 24 jam sekali sebanyak 2 mL.

4.5.4 Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Metode pembuatan stroke iskemik dilakukan menggunakan teknik MCAO. Kontrol positif dan kontrol terapi mendapatkan ekstrak antosianin ubi jalar ungu selama 1 minggu. Masing-masing kontrol diberi ekstrak antosianin sebanyak 2 mL.

Reperfusion iskemik daerah fokal otak dilakukan menggunakan teknik oklusi MCA (Middle Cerebral Artery) pada bagian leher sebelah kiri dengan beberapa modifikasi. Hewan coba dianestesi menggunakan ketamine dan xylazine dengan perbandingan 3:7. Suhu tubuh hewan coba dijaga pada temperature 37 °C . Berdasarkan pada struktur irisan kulit, pembuluh darah berupa CCA (Common

Carotid Artery), ECA (External Carotid Artery) dan ICA (Internal Carotid Artery) dibuka secara hati-hati dan dilakukan pengikatan pada daerah CCA dan ECA. Setelah itu dilakukan penutupan luka kembali. Setelah 3 jam mengalami iskemik, ikatan pada daerah CCA dan ECA dibuka kembali dan luka akibat pembedahan ditutup kembali.

4.5.5 Pengambilan Otak Kecil

Sebelum pengambilan organ otak kecil, lebih dahulu dilakukan dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian leher dimana tikus diletakkan dengan posisi perut di atas pada papan pembedahan. Kemudian diambil bagian otak kecilnya. Organ otak kecil mula-mula dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9 %. Kemudian otak kecil dibagi menjadi dua dimana setengahnya dimasukkan dalam larutan buffer PFA dan sebagiannya langsung disimpan dalam freezer pada suhu -20 °C.

4.5.6 Embedding Otak Kecil

Langkah awal *embedding* organ otak kecil tikus putih adalah organ otak kecil direndam dalam larutan fiksatif. Kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Setelah itu organ otak kecil dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam, dengan etanol 90% selama 20 menit. Untuk perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya adalah memindahkan organ otak kecil pada xilol selama 20 menit. Kemudian organ otak kecil dicelupkan pada paraffin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat paraffin akan memadat dan organ otak kecil berada dalam blok paraffin.

4.5.7 Pembuatan Preparat Organ Otak Kecil

Langkah awal pembuatan preparat organ otak kecil adalah memasukkan jaringan otak kecil pada blok paraffin hasil embedding sebelumnya pada penjepit (*block holder*) mikrotom dan diatur sejajar dengan mata pisau mikrotom. Proses pemotongan diawali dengan mengatur kestabilan irisan diatas 10 μm untuk mempercepat bidang potong dengan ukuran 5 μm . irisan diambil dengan kuas dan dimasukkan ke dalam air pada suhu ruang untuk membuka lipatan yang mungkin terjadi pada preparat. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38 - 49 $^{\circ}\text{C}$ untuk meluruskan kerutan halus pada preparat. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan yang terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas hot plate pada suhu 38 - 40 $^{\circ}\text{C}$ sampai kering. Setelah itu preparat disimpan dalam incubator pada suhu 38 - 40 $^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

4.5.8 Pemeriksaan Ekspresi Beta Amyloid Secara Immunohistokimia

Preparat jaringan otak kecil yang telah dideparafinasi dengan Xylol, alcohol bertingkat dan aquades disimpan dalam oven selama 7 hari. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama menit kemudian diredam dalam hydrogen peroksida 1 % selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Penambahan antibody primer anti Beta Amyloid selama 2 jam dan disimpan pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Pemberian antibodi sekunder anti rabbit Ig dilakukan selama 1 jam pada yang dilanjutkan dengan pencucian kembali menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Preparat ditambahkan SA-HRP selama 1 jam pada suhu ruang diikuti

pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali dengan durasi 5 menit. Penambahan DAB selama 40 menit lalu dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan counterstain dengan Meyer Hematoxilen Eosin selama 20 menit. Dicuci kembali dengan air sebanyak 3 kali selama 5 menit dan dilanjutkan dengan mounting.

4.5.9 Pemeriksaan Ekspresi VEGF Secara Immunohistokimia

Slide jaringan otak kecil dideparafinasi dan disimpan dalam oven selama 7 hari. Preparat jaringan otak kecil dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Preparat direndam dalam hidrogen peroksida 1 % selama 20 menit dan antibody primer anti VEGF selama 2 jam yang dilanjutkan dengan pencucian oleh PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibody sekunder anti rabbit Ig pada suhu ruang selama 1 jam dan dilanjutkan dengan perendaman dalam PBS 3 kali 5 menit. SA-HRP ditambahkan pada preparat selama 40 menit dan didiamkan pada suhu ruang. Pencucian kembali dilakukan dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Pemberian counterstain dengan Meyer Hematoxilen Eosin selama 20 menit dan dilanjutkan pembilasan menggunakan air yang dilanjutkan dengan mounting.

4.5.10 Isolasi Protein Otak Kecil

Isolasi protein otak dilakukan dengan mengambil 0.5 gram sampel otak kecil. Otak kecil dihancurkan di atas mortar steril dengan pastel dingin yang berada di atas balok es. Selanjutnya ditambahkan larutan PBS-Tween:PMSF 1 μ L dengan perbandingan 9:1 dan ditambahkan sedikit pasir kuarsa. Semua bahan digerus dengan

pastel dingin yang diletakkan di atas balok es. Setelah semua bahan halus, dilakukan penambahan 4 mL larutan PBS-Tween:PMSF dengan perbandingan 9:1. Homogenat yang dihasilkan ditempatkan dalam tabung proipel steril dan divortex selama 10 menit. Proses vortex selesai, dilanjutkan dengan proses sonifikasi dengan sonikator selama 10 menit. Sampel yang telah divortex dan disonifikasi, kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Proses sentrifugasi menghasilkan endapan dan supernatant, lalu supernatant yang dihasilkan diambil dan ditambahkan dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1. Supernatan beserta etanol dihomogenkan dan dibiarkan mengendap selama semalam pada suhu 4°C. Sampel yang telah didiamkan selama 24 jam, disentrifugasi selama 15 menit dengan setrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm. Pelat yang dihasilkan diambil dan dikeringkan hingga bau etanol menghilang. Pelet ditambahkan dengan Tris-HCl pH 6,8 dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan sehingga didapatkan isolat protein otak kecil.

4.5.11 Pengukuran Kadar BDNF Secara ELISA

Konsentrasi BDNF dalam otak kecil diukur menggunakan Rat BDNF Elisa Kit (Elabscience). Pengukuran dilakukan berdasarkan instruksi perusahaan. Sebanyak 96 well *micro* ELISA *plate* telah dicoated antibody monoclonal anti-BDNF.. *Referance and Sample Diluent* ditambahkan sebanyak 100 µL pada well sebagai blanko dengan konsentrasi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 dan 0 pg/mL. Selanjutnya, sebanyak 100 µL larutan sampel dimasukkan ke dalam well dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37 °C. Biotinylated Detection Ab ditambahkan

100 μL pada masing-masing well dan diinkubasi kembali selama 1 jam pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. *Micro ELISA plate* dicuci dengan 350 μL *Wash Buffer* sebanyak tiga kali. Dilakukan penambahan HRP conjugate pada masing-masing well sebanyak 100 μL . Inkubasi sampel selama 30 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ dan dilakukan pencucian dengan *Wash Buffer* sebanyak lima kali. Tambahkan 90 μL Substrate solution lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Waktu reaksi dapat diperpendek atau diperpanjang tergantung pada perubahan warna yang terbentuk tapi tidak boleh lebih dari 30 menit. Ketika gradien warna terlihat pada well standar, reaksi harus dihentikan. Reaksi dihentikan dengan penambahan stop solution sebanyak 50 μL . Selanjutnya warna larutan berubah dari biru menjadi kuning. Pengukuran kadar BDNF dilakukan dengan mengukur optical density (nilai OD) sampel pada panjang gelombang 450 nm. Pengukuran dilakukan menggunakan micro-plate reader. Kadar BDNF didapatkan dengan membandingkan nilai OD dalam sampel dengan kurva standar.

4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis untuk mengetahui perbedaan hasil penelitian pada kelompok yang diuji. Analisis dilakukan secara statistik menggunakan SPSS dengan *one way anova*. Hasil pengolahan data ditunjukkan sebagai mean \pm SD. *One way anova* digunakan untuk membandingkan ekspresi Beta Amyloid, ekspresi VEGF dan kadar BDNF pada kelompok uji diikuti analisis *post hoc* dengan uji Turkey untuk menentukan perbedaan antara satu perlakuan dengan yang lain. Signifikansi statistik untuk seluruh test dilakukan dengan taraf signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).