BAB 3
METODE PENELITIAN

Penelitian ini menguji aktivitas spesifik katalase jaringan jantung tikus dengan menggunakan menggunakan metode spektrofotometri untuk mengukur penguraian H_2O_2.

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental deskriptif analitik untuk mengetahui aktivitas spesifik katalase dari sampel jaringan jantung hewan percobaan secara spektrofotometri. Penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap:

a. Pembuatan homogenat sampel
b. Penentuan absorbansi optimal
c. Pengukuran sampel
d. Analisis data
e. Pelaporan data

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan pelaksaan prosedur perlakuan *hypobaric chamber* dilakukan di Lakespra Saryanto. Penelitian berlangsung selama satu tahun (Juni 2008-Juni 2009).

3.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian lain di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Penelitian tersebut mengenai peran gen HIF1-α pada jaringan otak yang diinduksi hipoksia hipobarik akut berulang. Penelitian utama tersebut dan penelitian ini menggunakan sampel yang sama sehingga prosedur pengmbilan sampel penelitian ini dilakukan bersamaan dengan pengambilan sampel penelitian utama tersebut. Peneliti hanya mendapatkan sampel setelah dilakukan perlakuan serta pengambilan sampel (organ tikus

percobaan) di Lakespra Saryanto dan dibawa ke Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI.

Penelitian ini menggunakan tikus jantan galur Wistar berumur 8 (delapan) minggu dengan berat badan 150-250 gram sebagai hewan percobaan. Hewan percobaan kemudian dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan mendapat perlakuan hipoksia hipobarik (dalam *hypobaric chamber*).

Kelompok perlakuan dibagi 4 (empat) kelompok sesuai dengan banyaknya prosedur pemajanan dengan hipoksia hipobarik, yaitu kelompok I (terpapar 1 (satu) kali hipoksia hipobarik ILA awal *type* I *chamber flight profile*), kelompok II (terpapar dua kali hipoksia hipobarik, yaitu satu kali seperti kelompok I di atas dan 1 kali ILA penyegaran *type* II *chamber flight profile* untuk penerbang angkut), kelompok III (terpapar tiga kali hipoksia hipobarik, yaitu seperti kelompok II ditambah satu kali *type* II *chamber flight profile* untuk penerbang pengangkut), dan terakhir kelompok IV (terpapar 4 kali hipoksia, yaitu seperti kelompok III ditambah satu kali *type* II *chamber flight profile* untuk penerbang angkut). Interval untuk setiap perlakuan adalah 7 (tujuh) hari.

Semua hewan percobaan dipelihara sesuai kondisi standar pencahayaan (06.00-18.00) dan temperatur (22^{o}C) serta mendapat minum dan makan *ad libitum*. Pada hari ke-1, 8, 15, dan 22 sesuai dengan kelompok secara bertahap beberapa hewan percobaan dimasukkan ke dalam *hypobaric chamber*, mendapatkan perlakuan sesuai protokol di atas, kemudian diambil dari kandang perlakuan, dilakukan anestesi dengan eter, ditimbang dan dimatikan. Setelah itu jantung diambil dan ditimbang.

3.4 Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi

Kriteria inklusi adalah tikus percobaan tampak sehat yang mendapat perlakuan lengkap sesuai protokol di atas dan memenuhi keadaan hipoksia hipobarik dengan melihat hasil analisis gas darah (hipoksia jika saturasi oksigen <95%). Kriteria eksklusi adalah tikus percobaan yang tidak mendapat perlakuan lengkap sesuai protokol yang ditentukan, tidak memenuhi keadaan hipoksia hipobarik serta telah mati sebelum mendapat perlakuan sesuai protokol di atas.

3.5 Besar Sampel

Jumlah hewan coba pada penelitian ini menggunakan rumus Federer, yaitu: $(t-1)(n-1) > 15$

Pada rumus tersebut, t adalah jumlah perlakuan dan n adalah banyaknya sampel setiap kelompok perlakuan. Dengan rumus ini didapat jumlah sampel untuk masing-masing kelompok adalah minimal 5 (lima) ekor tikus. Total adalah 25 ekor tikus.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Identifikasi Variabel

Dalam penelitian ini digunakan variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikat yang diteliti ialah aktivitas spesifik katalase di jaringan jantung tikus percobaan. Sedangkan variabel bebas ialah keadaan hipoksia hipobarik akut berulang.

3.6.2 Bahan dan Alat

3.6.2.1 Bahan

a. Sampel jaringan jantung sesuai kriteria yang ditetapkan
b. H_2O_2 30% Merck
c. Phosphate Buffer Saline (PBS)
d. Na_2HPO_4 Merck
e. KH_2PO_4 Merck
f. NaCl Merck
g. Aquabidest
h. Bovine Serum Albumine (BSA) Merck
i. Dan lain-lain

3.6.2.2 Alat

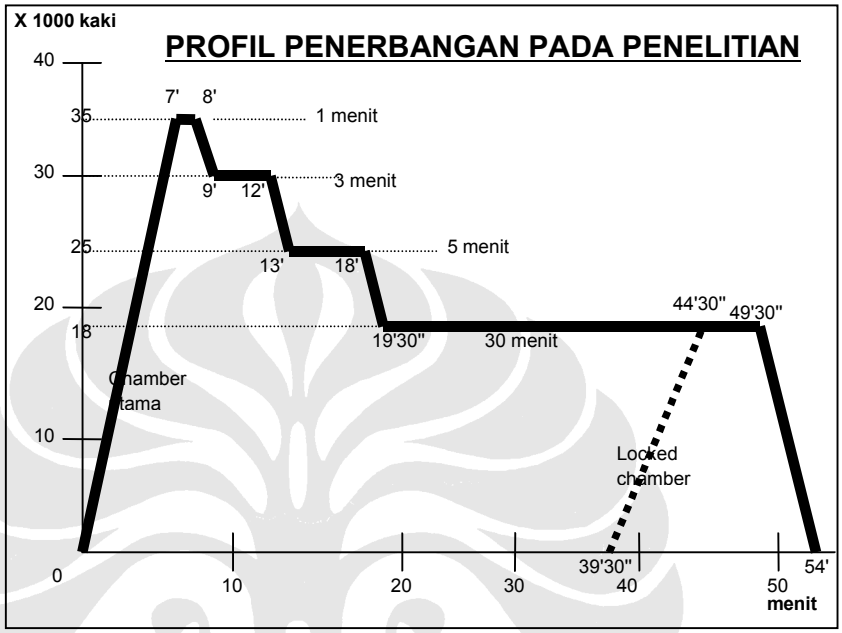
a. Neraca analitik
b. Mikropipet volume 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
c. Tip mikropipet 10 µl, 100 µl, 1000 µl
d. Mikrotube 1,5 ml dan 2 mL

e. Alat sentrifugasi Hettich
f. *Micropestle*
g. *Freezer* -80^{o}C
h. Spektrofotometer UV (Shimadzu)
i. Kuvet kaca
j. Alat-alat laboratorium (gelas gelas kimia, pipet, pinset, sendok, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, botol penyimpan larutan, dll)
k. Rak tabung
l. Alumunium foil
m. Sarung tangan karet
n. Alat tulis menulis

3.6.3 Perlakuan Hipoksia Hipobarik

a. Tikus percobaan dimasukkan ke dalam *hypobaric chamber*.
b. Dibuat perlakuan hipoksia akut selama 1 menit dengan dilakukan simulasi naik dari ketinggian 0 m (setinggi permukaan laut, *ground level*) ke ketinggian 35,000 kaki dengan *rate of climb* 5,000 kaki/menit.
c. Dibuat perlakuan hipoksia akut selama 3 menit dengan dilakukan simulasi turun dari ketinggian 35,000 kaki ke ketinggian 30,000 kaki dengan *rate of descend* 5,000 kaki/menit.
d. Dilakukan simulasi turun dari ketinggian 30,000 kaki ke ketinggian 18,000 kaki dengan *rate of descend* 5000 kaki/menit. Ketinggian 18,000 kaki dipertahankan selama 30 menit untuk perlakuan hipoksia selama 30 menit. Tikus yang akan diberi perlakuan hipoksia hipobarik berulang tetap berada dalam *hypobaric chamber* hingga prosedur *hypobaric chamber* selesai, namun tidak dibedah.
e. Di *setting* ketinggian 18.000 kaki, setelah mencapai menit ke-20, segera petugas yang akan melakukan bedah tikus masuk ke *locked chamber*, dan naik ke ketinggian 18,000 kaki dengan *rate of climb* 4,000 – 5,000 kaki/menit. Pada menit ke 25, petugas masuk ke ruangan *hypobaric chamber* utama untuk persiapan pembedahan tikus dengan

segera menggunakan masker oksigen 100% di *chamber* utama yang harus tetap dipakai selama proses pembedahan. (lampiran 1)



Gambar 3.1. Profil penerbangan pada penelitian

3.6.4 Pengambilan Sampel

a. Di dalam *hypobaric chamber* dengan *setting* ketinggian 18,000 kaki, lima ekor tikus dibius total dengan anestesia dalam dengan dimasukkan moncongnya ke dalam kontainer khusus berisi eter cair selama 1 s.d. 2 menit.
b. Tikus yang telah berada dalam keadaan terbius ditimbang, kemudian dilakukan bedah tikus sesuai protokol untuk diambil organ jantung dari masing-masing tikus.
c. Sampel dimasukkan ke dalam kotak pendingin berisi es kering (*dry ice*)
d. Segera setelah pembedahan selesai dilakukan, dilakukan simulasi turun dari ketinggian 18,000 kaki ke ketinggian 0 kaki dengan *rate of descend* 4,000 kaki/menit.

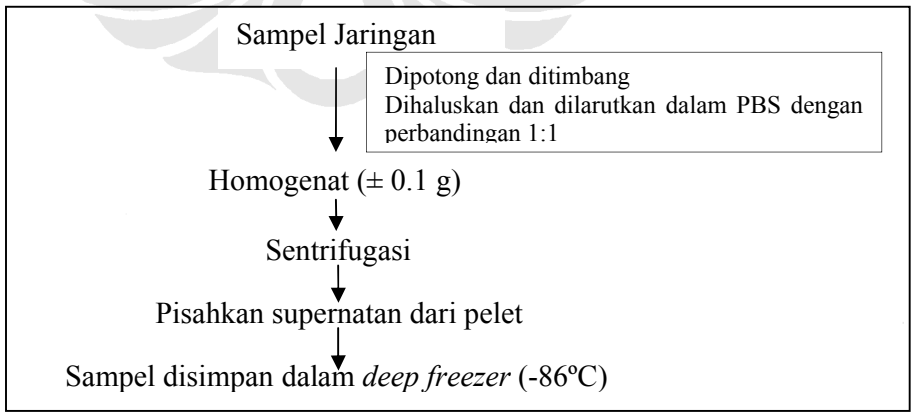
e. Sampel segera dikirimkan ke Laboratorium Biomolekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.6.5 Pembuatan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 0,05 M dengan pH 7. Sebanyak 5,4376 g Na_2HPO_4 ditambah dengan 2,6469 g KH_2PO_4 dan 2,250 g NaCl, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga volumenya mencapai 500 ml. Selanjutnya diukur pH larutan dengan menggunakan pH meter hingga diperoleh pH 7.

3.6.6 Pembuatan Homogenat Sampel

Sampel jaringan jantung yang telah diambil dari tikus percobaan dipotong menjadi ukuran-ukuran kecil kemudian ditimbang. Dibuat homogenat dengan ditambahkan dengan PBS pada sampel dengan perbandingan sampel:PBS = 1:1 secara bertahap sambil terus dihaluskan menggunakan *micropestle*. Setelah itu, homogenat yang telah dibuat disentrifugasi menggunakan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4ºC selama 10 menit. Kemudian dipisahkan supernatan dari pelet. Sampel lalu disimpan di *deep freezer* (-86ºC) hingga siap untuk digunakan. (gambar 3.2.)



Gambar 3.2. Bagan pembuatan homogenat jaringan

3.6.7 Optimasi Pengukuran

Pengukuran aktivitas spesifik katalase ini menggunakan metode Mates et al (1999)[22] yang dioptimasi kembali sehingga pengukuran optimal pada setiap langkah harus ditentukan terlebih dahulu.

3.6.7.1 Penentuan Absorbansi Pengenceran H_2O_2 yang Optimal

Pada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler telah dilakukan penentuan absorbansi pengenceran H_2O_2 yang optimal pada bulan Agustus 2008. Dari hasil tersebut, absorbansi H_2O_2 30% yang optimal jika diukur dengan spektrofotometri didapatkan pada pengenceran H_2O_2 : pelarut = 1 : 4000.

3.6.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pada Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler telah dilakukan penentuan absorbansi pengenceran H_2O_2 yang optimal pada bulan Agustus 2008. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa panjang gelombang maksimum untuk melakukan pengukuran H_2O_2 30% adalah pada panjang gelombang 210 nm.

3.6.7.3 Penentuan Kinetik Katalase

Dilakukan pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh blanko setiap menit selama 10 menit. Dilakukan juga pengukuran absorbansi H_2O_2 oleh sampel setiap menit selama 10 menit.

Pengukuran absorbansi blanko dilakukan dengan mempipetkan ke dalam kuvet 950 µL larutan H_2O_2 dengan pengenceran optimal, kemudian ditambahkan dengan 50 µL pelarut, lalu dilakukan homogenisasi dengan pengocokan manual dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimal. Pada pengukuran absorbansi sampel, 50 µL sampel ditambahkan pada 950 µL H_2O_2 dengan pengenceran optimal, untuk selanjutnya dilakukan prosedur serupa dengan pengukuran blanko.

Selanjutnya penguraian H_2O_2, baik oleh blanko maupun sampel didapat dengan cara mengurangkan absorbansi di awal (t_0) dengan absorbansi pada menit-menit selanjutnya (menit ke-x, t_x). Selisih penguraian oleh sampel dikurangkan dengan selisih penguraian H_2O_2 oleh blanko, kemudian dihitung kecepatan reaksi

setiap menit sehingga didapatkan waktu terbaik penguraian H_2O_2 oleh sampel. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel dan dibuat kurvanya.

3.6.7.4 Penentuan Pengenceran Optimal Sampel

Dibuat pengenceran bertingkat pada homogenat sampel dengan PBS 0,05 M dengan perbandingan 1 :100, 1 :500, 1 :1000, 1 :2000, 1 :4000. Dilakukan pengukuran serapan sampel dengan prosedur serupa dengan pengukuran pada tahap sebelumnya (penentuan kinetik katalase), dimulai dari t_0 hingga t_x (waktu optimum). Hasil pengukuran dicatat dalam bentuk tabel dan dibuat kurvanya.

3.6.8 Penentuan Kadar Protein

3.6.8.1 Penentuan Kurva Standar Protein

Untuk menentukan kurva standar protein, ditimbang 50 mg BSA untuk kemudian dilarutkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:1. Larutan BSA kemudian diencerkan dengan perbandingan 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 untuk selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 280 nm**.** Hasil pengukuran dicatat dalam tabel dan dibuat kurvanya. Dari kurva tersebut dicari rumus

3.6.8.2 Penentuan Konsentrasi Protein Jantung

Untuk menentukan konsentrasi protein pada jantung, dilakukan pengukuran absorbansi homogenat yang telah diencerkan dengan PBS pada perbandingan 1 :500 pada panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran dicatat dalam tabel. Konsentrasi protein (mg/ml homogenat) jantung kemudian dihitung dengan menggunakan rumus yang didapat dari kurva standar protein. Hasil pengukuran dan penghitungan dicatat dalam bentuk tabel.

3.6.9 Penentuan Aktivitas Spesifik Katalase Sampel

Katalase adalah antioksidan enzimatik yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O dan molekul O_2.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

Dekomposisi H_2O_2 diamati secara spektrofotometri berdasarkan penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran aktivitas katalase dilakukan pada pH 7,0 karena suasana yang terlalu asam atau basa dapat menyebabkan hilangnya aktivitas katalase. Perhitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut: Aktivitas Katalase (Unit/ ml) =

$$\frac{(\Delta \text{ Absorbansi Uji} - \Delta \text{ Absorbansi Blanko})/\text{menit}}{(\text{molaritas } H_2O_2) \times (\text{volume sampel yang diukur})} \times \text{faktor pengenceran}$$

Hasil perhitungan tersebut kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik katalase (U/mg protein). Semua hasil dicatat dalam tabel.

$$\text{Aktivitas spesifik katalase (U/mg prot)} = \frac{\text{Aktivitas Katalase (U/mL)}}{\text{Kadar Protein dalam Sampel (mg/mL)}}$$

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Semua hasil perhitungan aktivitas pesifik katalase (Unit/mg) dicatat dan diolah dengan uji statistik dalam program *Microsoft Excel* dan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Pada penelitian ini dilakukan analisa statistik untuk uji hipotesis komparatif skala pengukuran numerik lebih dari 2 kelompok data tak berpasangan. Jika sebaran data normal menurut uji normalitas Shapiro-Wilk, digunakan metode uji *anova*. Jika sebaran data tidak normal, digunakan metode uji Kruskal-Wallis.

3.8 Pelaporan Data

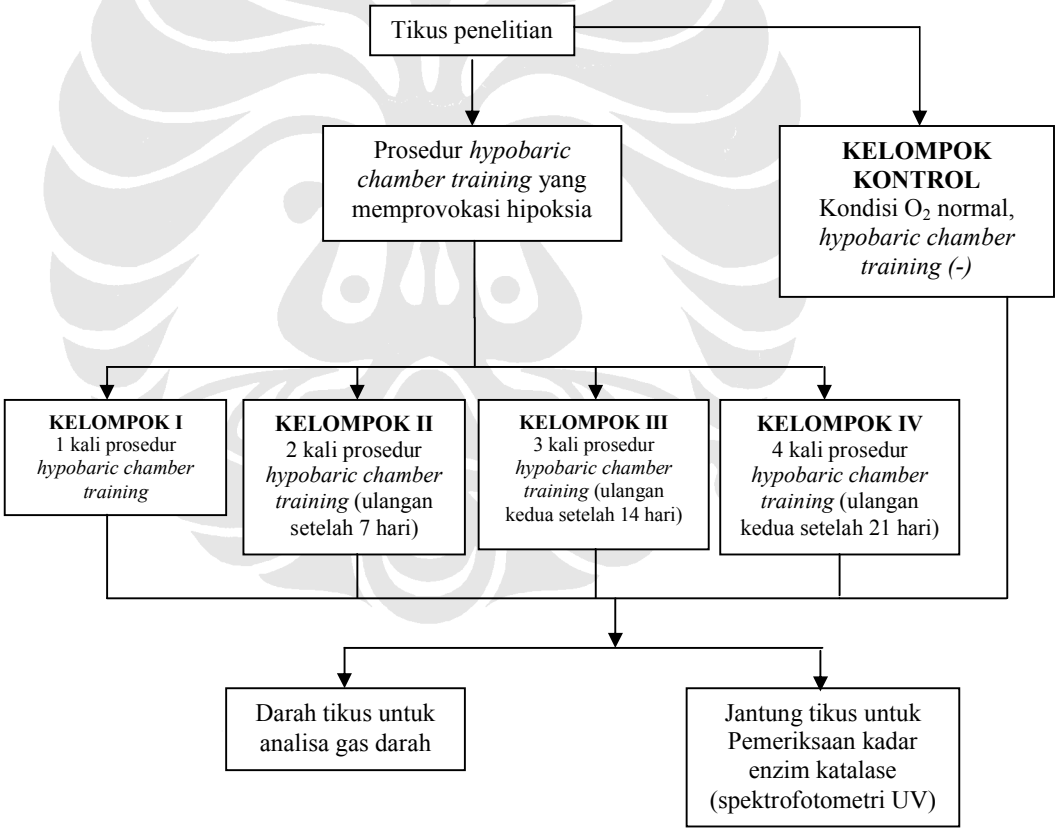
Data disusun dalam bentuk laporan penelitian yang selanjutnya dipresentasikan kepada staf pengajar Modul Riset Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.9 Definisi Operasional

a. 1 Unit (U) : jumlah enzim yang mengkatalisis reaksi 1 μM substrat per menit.

b. Aktivitas spesifik katalase : laju reaksi katalase dalam memecah H_2O_2; jumlah H_2O_2 yang terurai per mg katalase dalam sampel, per satuan waktu.
c. Hipobaria: tekanan lebih rendah dari tekanan atmosfer (1 atm = 760 Torr = 101,325 Pa = 1.01325 = FiO_2 21%).
d. Hipoksia Hipobarik: keadaan dimana saturasi oksigen di bawah 95% akibat paparan ketinggian 9750 kaki di atas permukaan laut.
e. Akut Berulang: paparan hipoksia hipobarik yang terjadi segera dan berulang waktu yang lain diselingi dengan episode normoksia.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3. Bagan alur penelitian