

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian bersifat eksperimental *in vitro* yang terdiri dari uji fitokimia kualitatif, kapasitas total DPPH, fenolik, flavonoid, uji toksisitas ekstrak buah *Aegle marmelos* dan uji *in vivo* untuk mengetahui dampak pemberian ekstrak buah *Aegle marmelos* terhadap aktivitas spesifik enzim katalase pada otak *Sprague Dawley* yang kemudian diinduksi hipoksia sistemik kronik.

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta; Laboratorium Hewan Coba, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes serta di Pusat Studi Biofarmaka Jalan Taman Kencana Kampus IPB No 3, Babakan, Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat 16128. Penelitian berlangsung sekitar 5 bulan, mulai bulan Januari 2018 sampai Mei 2018.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah buah *Aegle marmelos* yang diperoleh dari Taman Buah Mekarsari di Cileungsi, Jawa Barat dan untuk hewan coba menggunakan tikus jantan *Sprague Dawley* dengan berat badan 250 gram dan berumur 10-12 minggu. Tikus didapatkan dari Laboratorium Hewan Coba, Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes. Tikus *Sprague Dawley* dibagi dalam 8 kelompok, P1 adalah kelompok yang tidak dicekok dan normoksia. P2-P4 adalah kelompok yang tidak dicekok tapi mendapat perlakuan hipoksia, P5 adalah kelompok yang dicekok dan normoksia. P6-P8 adalah kelompok yang dicekok dan mendapat perlakuan hipoksia.

3.4 Perkiraan Besar Sampel

Jumlah sampel hewan coba pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer²⁶, yaitu

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

Pada rumus tersebut, n adalah banyaknya sampel setiap kelompok perlakuan dan t adalah jumlah perlakuan. Pada penelitian ini, terdapat delapan perlakuan yang akan dilakukan, sehingga dengan rumus tersebut didapat jumlah sampel untuk masing-masing kelompok adalah:

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Jumlah tikus dari tiap kelompok perlakuan berdasarkan perhitungan diatas adalah 4 ekor, sehingga jumlah tikus untuk 8 kelompok adalah 32.

3.5 Kriteria Eklusi dan Inklusi

3.5.1 Kriteria Inklusi dan Eklusi Hewan Coba

3.5.1.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* jantan dengan berat badan 250 gram, berumur 10-12 minggu, dalam keadaan sehat dan aktivitas yang normal.

3.5.1.2 Kriteria Eklusi

Kriteria eklusi pada penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley* betina, tikus dalam keadaan sakit, tikus yang mati dan pernah terpapar zat-zat aktif dan berbahaya.

3.6 Prosedur Kerja Penelitian

3.6.1 Proses Pembuatan ekstrak buah *Aegle marmelos*

Buah *Aegle marmelos* ditimbang sebanyak 1 kg lalu dipotong-potong hingga tipis, dikeringkan lalu dihancurkan menjadi bubuk simplisia menggunakan *grinder*, kemudian bubuk simplisia di ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 gram bubuk simplisia di rendam dalam ethanol absolut dan

didiamkan dalam suhu ruangan selama 48 jam. Proses diulangi sebanyak 2 kali, hasil maserasi kemudian di evaporasi dengan menggunakan vakum evaporator sampai berbentuk seperti pasta. Dosis ekstrak *Aegle marmelos* yang akan diberikan pada tikus adalah 400 mg/kgBB per hari.

3.6.2 Uji Fitokimia Kualitatif

3.6.2.1 Uji Alkaloid dengan metode Dragendorff dan Meyer²⁷

Ekstrak buah *Aegle marmelos* dilarutkan dengan 4 mL kloroform lalu ditambahkan 1 mL amonia. Kemudian ditambahkan H₂SO₄ 2N sebanyak 10 tetes, lalu di kocok kurang lebih ½ menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan bagian atas diambil dan di pindahkan ke lubang plat tetes dan di teteskan ke 3 lubang yang berbeda. Lubang pertama, ditambahkan dengan 2 tetes aquadest sebagai kontrol. Lubang kedua, ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendorf dan lubang ketiga ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Meyer. Uji Alkaloid positif bila terdapat endapan putih untuk pereaksi Meyer dan endapan jingga pada pereaksi Dragendorf.

3.6.2.2 Uji Steroid dan Terpenoid dengan metode Lieberman-Buchard²⁷

Ekstrak diletakkan secukupnya pada 3 lubang plat tetes, lalu ditambahkan 0,5 ml kloroform dan dikeringkan. Kemudian tambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat pada lubang pertama dan kedua lalu diaduk. Kemudian di tambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat pada kedua lubang. Pada lubang ketiga di tambah asam asetat anhidrat sebagai kontrol. Uji steroid disebut positif bila terdapat perubahan warna menjadi hijau sampai biru, dan uji terpenoid positif bila terdapat perubahan warna menjadi cincin merah kecoklatan.

3.6.2.3 Uji Fenolik

Ekstrak diambil secukupnya kemudian dilarutkan dengan methanol pada dua tabung reaksi. Lalu larutan diteteskan pada plat tetes, lubang pertama sebagai kontrol dan lubang kedua ditambahkan FeCl₃ 1%. Uji Fenolik disebut positif apabila terdapat endapan berwarna hijau, biru atau ungu.

3.6.2.4 Uji Flavonoid

Ekstrak diambil secukupnya dan diletakkan pada tabung reaksi, kemudian ditambahkan NaOH 10% sebanyak 2 mL lalu di kocok selama 2 menit. Larutan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan, kemudian lapisan bagian bawah diambil menggunakan pipet dan dipindahkan ke tabung reaksi lain. Pada tabung tersebut di tambahkan 3 tetes HCl 2 N sampai warna hilang lalu ditambahkan 3 mL eter setelah itu di kocok dan didiamkan sampai muncul lagi dua lapisan. Lapisan bagian atas diambil lalu ditambahkan 3 tetes ethanol kemudian dipisahkan dalam dua tabung yang berbeda. Tabung pertama ditambahkan 0,1 gram logam Magnesium dan 1 mL HCl pekat, setelah itu di diamkan selama 3 menit. Sedangkan tabung kedua digunakan sebagai kontrol. Uji Flavonoid disebut positif bila terdapat endapan kuning kemerahan.

3.6.3 Pengukuran DPPH dengan metode Blois³⁰

3.6.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Diambil 1,97 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol sampai 100mL sehingga didapatkan konsentrasi 50mM / mL. Lalu diambil 3,5 mL larutan DPPH dan ditambahkan 0,5 mL metanol, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit di tempat gelap. Setelah itu serapan di ukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 sampai 800 nm. Setelah itu didapatkan panjang gelombang maksimum dan absorbansi digunakan sebagai blanko.

3.6.3.2 Pemeriksaan Asam Askorbat

Bubuk Asam askorbat diambil sebanyak 0,01 gram dan dilarutkan menggunakan metanol sampai 100 mL sehingga di dapatkan konsentrasi 100 µg / mL. Lalu larutan tersebut dipipet sebanyak 0,2 , 0,3 , 0,4, 0,5 dan 0,6 mL kemudian dilarutkan kembali menggunakan metanol hingga 10 mL, lalu didapatkan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 µg / mL. Setelah itu larutan di vortex sampai rata dan diambil sebanyak 0,5 mL pada masing-masing konsentrasi lalu larutan ditambahkan ke dalam 3,5 mL DPPH yang sudah disiapkan. Larutan yang sudah ditambahkan ke dalam DPPH di tutup menggunakan aluminium foil dan divortex

kembali hingga homogen. Setelah homogen larutan di inkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH. Data konsentrasi dan absorbansi yang di dapat digunakan untuk mencari % inhibisi untuk membuat kurva standar. Dari kurva standar di dapatkan persamaan garis linear dan didapat nilai IC₅₀.

3.6.3.3 Pemeriksaan Kapasitas Total Antioksidan Ekstrak Buah Maja

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,05 gram lalu dilarutkan dengan metanol hingga 100 mL sehingga di dapatkan konsentrasi 0,5 mg / mL. Lalu larutan diambil sebanyak 0,2, 1, 2, 3, 4 mL kemudian dilarutkan dalam labu takar hingga 10mL dengan pelarut metanol sehingga di dapatkan konsentrasi 10, 50, 100, 150, 200 µg/mL. Larutan di vortex sehingga homogen lalu diambil 3,5 mL larutan DPPH dan ditambahkan sebanyak 0,5 mL dari masing-masing konsentrasi larutan ekstrak. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit di tempat gelap dan diukur serapannya menggunakan panjang gelombang serapan maksimum larutan DPPH.

3.6.3.4 Pengolahan Data DPPH

Absorbansi yang didapat dihitung % inhibisi dengan menggunakan rumus :

$$\%inhibisi = \frac{\text{Abs. Kontrol} - \text{Abs. Sampel}}{\text{Abs. Kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi sampel : serapan sampel pada panjang gelombang maksimum

Absorbansi kontrol : serapan DPPH pada panjang gelombang maksimum

Lalu dari % inhibisi, dibuat kurva standar. Dari kurva standar di dapatkan persamaan garis linear dan didapat IC₅₀.

3.6.4 Pengukuran Kadar Fenolik Kuantitatif ekstrak buah *Aegle marmelos*

3.6.4.1 Pembuat Kurva Kalibrasi Tannin dengan Reagen Folin-Ciocalteu

Ditimbang 0,25 gram tannin lalu dilarutkan dengan ethanol absolut 5mL dan ditambahkan aquadest sampai 50 mL sehingga didapatkan konsentrasi 5 mg/mL.

Dari larutan induk, di pipet sebanyak 6, 8, 10, 12 dan 14 mL lalu diencerkan dengan aquadest hingga mencapai volume 100mL sehingga didapatkan konsentrasi 300, 400, 500, 600 dan 700 µg/mL. Dari masing-masing konsentrasi di pipet 0,2 mL lalu ditambahkan 15,8 mL aquadest dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu kemudian di kocok. Setelah itu di diamkan selama 8 menit lalu di tambahkan 3 mL larutan Na₂CO₃ 20% dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 2 jam di tempat gelap pada suhu kamar lalu diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 765 nm. Dari hasil pemeriksaan panjang gelombang pada berbagai konsentrasi, di dapatkan nilai absorbansi. Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari kurva standart tannin. Dari kurva standar tannin di dapatkan persamaan garis linear yang digunakan untuk mencari kadar fenolik dari sampel.

3.6.4.2 Penentuan Kandungan Fenol Total dengan metode Singelton dan Rossi²⁸

Ditimbang 0,3 gram ekstrak lalu dilarutkan dengan methanol dan air dengan perbandingan 1 : 1 sebanyak 10 mL. Dari larutan induk di pipet 0,2 mL lalu ditambahkan 15,8 mL aquadest dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu kemudian di kocok. Setelah itu di diamkan selama 8 menit lalu di tambahkan 3 mL larutan Na₂CO₃ 20% dikocok hingga homogen. Larutan didiamkan selama 2 jam di tempat gelap pada suhu kamar lalu diukur serapan pada panjang gelombang maksimum 765 nm yang akan memberikan kompleks berwarna biru. Tindakan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali.

3.6.5 Pengukuran kadar Flavonoid Kuantitatif ekstrak buah *Aegle marmelos*

3.6.5.1 Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg kuersetin dan dilarutkan dengan etanol dalam labu takar 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi 1 mg / mL. Diambil 1 mL dari larutan induk dan di larutkan dalam labu takar 10 mL dengan pelarut etanol sehingga didapatkan konsentrasi 0,1 mg / mL. Dari larutan ini diambil 0,5; 1; 1,5; 2 mL lalu dilarutkan dalam labu takar 10 mL dengan ethanol sehingga didapatkan konsentrasi 5, 10, 15 dan 20 µg / mL. Lalu diambil 0,5 mL dari masing-masing konsentrasi larutan tersebut dan direaksikan dengan 2 mL aquadest dan 0,15 mL NaNO₂ 5% lalu

didiamkan selama 6 menit. Kemudian ditambahkan AlCl_3 10% 0,15 mL dan didiamkan selama 6 menit. Setelah itu ditambahkan NaOH 4% sebanyak 2 mL lalu ditambahkan aquadest hingga volume total mencapai 5 mL lalu didiamkan selama 15 menit. Kemudian larutan diukur dengan panjang gelombang 510 nm. Dari hasil pemeriksaan panjang gelombang pada berbagai konsentrasi, di dapatkan nilai absorbansi. Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari kurva standart kuersetin. Dari kurva standar kuersetin di dapatkan persamaan garis linear yang digunakan untuk mencari kadar flavonoid dari sampel.

3.6.5.2 Penentuan Kandungan Flavonoid dengan metode Woisky dan Salatino²⁹

Ditimbang 0,25 gram ekstrak buah *Aegle marmelos* lalu dilarutkan dengan metanol hingga 25 mL sehingga didapatkan konsentrasi 10 mg / mL. Lalu diambil 2,5 mL larutan dan ditambahkan 0,75 mL NaNO_2 5% dan didiamkan selama 6 menit. Setelah itu ditambahkan 10 mL aquadest kemudian ditambahkan AlCl_3 10% 0,75 mL dan NaOH 4% sebanyak 10 mL lalu ditambahkan aquadest hingga volume total mencapai 20 mL. Larutan didiamkan selama 15 menit lalu di baca dengan panjang gelombang 510 nm. Tindakan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali.

3.6.6 Uji Toksisitas menggunakan metode Meyer³¹

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) oleh Meyer³¹. Metode ini menguji toksistas suatu ekstrak berdasarkan nilai mortalitas dari larva udang *A. salina*. Ekstrak dapat disebut sebagai senyawa aktif apabila memiliki nilai LC_{50} (lethal concentration) < 1000 μg / mL. LC_{50} merupakan jumlah konsentrasi dari ekstrak yang mampu menyebabkan kematian larva sejumlah 50% setelah diinkubasi selama 24 jam.

3.6.6.1 Persiapan Larva Udang

Untuk mendapatkan larva udang, telur udang sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam wadah berisi air laut 250 mL, lalu disinari lampu dan di beri aerator untuk menyuplai oksigen ke dalam air lalu didiamkan selama 48 jam.

3.6.6.2 Persiapan Ekstrak

Sebanyak 20 mg ekstrak *Aegle marmelos* dicampurkan dengan air laut sebanyak 10 mL lalu di homogenasi sehingga terbentuk stok sampel 2000ppm. Lalu ditambahkan larutan tween 80% sebanyak 2 tetes.

3.6.6.3 Pengujian toksisitas

Larva udang sebanyak 10 ekor dipipet menggunakan mikropipet dari 1000 μ L air laut dan dimasukkan ke dalam 4 tabung ukuran 2000 μ L. Lalu ditambahkan ekstrak *Aegle marmelos* dengan konsentrasi 10, 100, 500, dan 1000 ppm. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 kali lalu vial diletakkan selama 24 jam di dalam suhu ruangan. Setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung dan di buat kurva korelasi persen kematian untuk mendapatkan persamaan linear untuk mencari LC₅₀.

3.6.7 Proses Persiapan Perlakuan dan Pembagian Kelompok Tikus

Tikus *Spargue Dawley* dibagi 8 kelompok yang terdiri dari 4 ekor tikus per kelompok, P1 adalah kelompok yang tidak di cekok ekstrak dan normoksia. P2-P4 adalah kelompok yang tidak di cekok tapi mendapat perlakuan hipoksia, P5 adalah kelompok yang di cekok ekstrak dan tidak di hipoksia. P6-P8 adalah kelompok yang di cekok ekstrak dan mendapat perlakuan hipoksia. Pencekohan ekstrak dilakukan selama 14 hari sebanyak 2 kali per hari dengan dosis 400 mg/kg/BB. Pada saat pencekohan tikus diberi makan dan minum secara *ad libitum*, lalu diberikan perlakuan yang baik untuk mengurangi stres pada tikus.

3.6.8 Proses Hipoksia

Hipoksia dilakukan menggunakan *hypoxic chamber* dan dialiri gas dengan komposisi 8% oksigen (O₂) dan 92% nitrogen (N₂). Secara berturut-turut P1 dan P5 tidak di hipoksia, P2 dan P6, P3 dan P7, P4 dan P8 diberi perlakuan hipoksia selama 3,7,dan 14 hari. *Hypoxic chamber* dibubuhi serbuk gergaji, diberi kipas, dan hasil ekspirasi dikontrol dengan soda lime agar *chamber* tidak berembun, disediakan makanan dan minuman secara *ad libitum*. Kecepatan tabung gas

adalah 5 mL per menit dan digunakan selama 15 menit untuk flushing, setelah stabil kecepatan aliran diubah menjadi 3 mL per menit. Bila semua telah siap, tikus ditimbang lalu dimasukkan ke dalam chamber.

3.6.9 Pengambilan Sampel Otak dan Darah Tikus

Setelah masa perlakuan selesai, tikus dikeluarkan dari *chamber* dan ditimbang setelah itu dianestesi dengan ketamin sebanyak 100 mg/kg/BB dan xylazine 10 mg/kg/BB. Tempat penyuntikan terletak pada regio intraperitoneal. Setelah tikus percobaan tidak lagi bergerak dan pingsan, dilakukan antiseptik pada bagian dada dan dilakukan pembedahan tikus. Pertama kali diambil adalah sampel darah pada apeks jantung tikus percobaan menggunakan jarum semprit 3 cc yang berisi EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), darah akan digunakan untuk pengujian aktivitas enzim spesifik katalase. Pengambilan sampel otak dengan melakukan pembedahan pada daerah kranium tikus percobaan. Organ otak dimasukkan ke dalam plastik klip dan dimasukkan ke dalam pendingin pada suhu -20°C .

3.6.10 Pembuatan Homogenat Sampel dan Lisat Darah 50%

Jaringan otak yang disimpan di dalam freezer diambil lalu dipotong dan ditimbang sebanyak 0,1 gram. Setelah itu otak dimasukkan ke dalam *microtube* dan ditambahkan pelarut dapar fosfat 0,1 M pH 7,2 sebanyak 500 μL dengan menggunakan *micropipete* dan dihaluskan dengan menggunakan grinder dalam suhu yang rendah dengan meletakkan potongan es. Setelah menjadi homogenat, campuran ditambahkan 500 μL dapar fosfat 0,1 M dengan pH 7,2 hingga volume mencapai 1 mL. Hasil homogenat kemudian di sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Dari hasil sentrifugasi, didapatkan supernatan. Supernatan dimasukkan ke dalam *microtube* lalu disimpan ke dalam freezer dengan suhu -20°C . Supernatan digunakan untuk pemeriksaan aktivitas enzim spesifik katalase.

Darah yang diambil dari tikus, diukur volume lalu ditandai kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm kemudian supernatan dibuang. Selanjutnya tambahkan dapar fosfat 0,1 M pH 7,2 ke dalam plasma darah hingga mencapai volume awal lalu di sentrifuge kembali sampai terbentuk

supernatan yang jernih lalu supernatan yang jernih dibuang. Lalu tambahkan akuades dingin hingga mencapai volume awal sehingga lisat 50% siap untuk uji aktivitas enzim spesifik katalase.

3.6.11 Pembuatan Larutan Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

Pengenceran H_2O_2 dengan konsentrasi 27,203mM dibuat dengan perbandingan 1:4000 yaitu diambil 0,025mL H_2O_2 30% dan dilarutkan dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sampai 100mL.

3.6.12 Optimasi Waktu dan Pengenceran

Optimasi waktu dan pengenceran dilakukan dengan mengukur absorbansi blanko dan uji menggunakan panjang gelombang 210 nm. Alat spektrofotometer disesuaikan panjang gelombangnya menjadi 210 nm dan di *autozero* menggunakan larutan PBS 1 mL dengan konsentrasi 50mM pH 7. Setelah stabil, absorbansi blanko diukur dengan memipet 50 μ L PBS 50mM pH 7 ke dalam kuvet lalu ditambah dengan 950 μ L H_2O_2 27,203 mM selama 1 menit, setelah itu diukur absorbansinya pada spektrofotometer. Absorbansi di catat tiap 1 menit selama 10 menit.

Pengukuran absorbansi uji dilakukan dengan memipet 950 μ L H_2O_2 27,203 mM ke dalam kuvet lalu ditambah dengan 50 μ L sampel (lisat atau supernatan) selama 1 menit. Absorbansi di catat tiap 1 menit selama 10 menit. Optimasi pengenceran didapatkan dengan melakukan pengenceran pada sampel dengan pengenceran 5x, 10x dan 20x untuk supernatan dan pengenceran 5x, 10x, dan 50x untuk lisat. Absorbansi yang di dapat tiap menit di catat dan di hitung ΔV nya untuk mendapatkan waktu optimal yang dibutuhkan untuk memperoleh aktivitas spesifik enzim katalase optimum.

3.6.13 Penentuan Kurva Standar Protein

Penentuan Kurva Standar Protein menggunakan metoda Christian Warburg³². Larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) diencerkan sehingga di dapatkan konsentrasi 0,025 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, dan 0,8 mg/mL. Lalu setiap larutan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm. Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari kurva standart BSA. Dari kurva standar di dapatkan persamaan garis linear lalu hasil dari persamaan linear digunakan untuk menghitung kadar protein sampel (lisat dan supernatan). Kadar protein sampel yang didapat akan digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik dari enzim katalase.

3.6.14 Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Darah dan Otak

Aktivitas spesifik enzim katalase diuji sesuai dengan metode Mates³³. Supernatan diencerkan sesuai dengan hasil optimasi pengenceran menggunakan larutan PBS 50 mM pH 7. Setelah itu siapkan tabung reaksi berisi 950 μ L H₂O₂ 27,203 mM, kemudian dicampur dengan supernatan sebanyak 50 μ L yang sudah diencerkan menggunakan mikropipet. Setelah itu, larutan di vortex dan di pindahkan ke dalam kuvet lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 210 nm. Proses ini dikerjakan dalam waktu 1 menit. Kemudian absorbansi di catat tiap 1 menit selama 2 menit. Penentuan aktivitas spesifik enzim katalase dihitung berdasarkan rumus :

$$\frac{\Delta Absorbansi Uji - \Delta Absorbansi Blanko}{Molaritas H_2O_2 \times Volume} \times Faktor Pengencer$$

3.6.15 Pembuatan Sediaan Patologi Anatomi Otak

Organ otak yang telah diambil dari tikus di bungkus oleh kertas saring kemudian dicelupkan ke dalam formalin 10% selama 4 jam. Kemudian organ dipotong dan di dehidrasi menggunakan aseton selama 30 menit, dilakukan pengulangan tindakan sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan proses *clearing* menggunakan larutan *xylol* selama 10 menit yang diulang sebanyak 2 kali. Setelah proses *clearing* selesai dilanjutkan dengan proses infiltrasi dengan cara memanasakan

parafin terlebih dahulu pada suhu 45 sampai 60°C selama 30 menit. Setelah seluruh parafin mencair, dilakukan proses *embedding* dengan cara parafin panas dan organ otak dimasukkan ke dalam cetakan khusus yang kemudian dibiarkan mendingin sampai parafin mengeras. Kemudian dipotong sekitar 5 micron dan dimasukkan ke dalam *water bath* berisi air hangat. Lalu organ diambil menggunakan kaca preparat dan diwarnai. Potongan organ tersebut kemudian direndam ke dalam alkohol 70%, 80% dan 90% kemudian dicelupkan ke dalam air. Sediaan organ di rendam ke dalam larutan hematoxillin selama 1 menit lalu dicuci menggunakan air sampai bersih, selanjutnya dicelupkan ke dalam larutan HCl sebanyak 1 kali, dibilas menggunakan air bersih dan dicelupkan lagi ke dalam larutan eosin sebanyak 10 kali. Setelah itu dicelupkan ke dalam larutan ethanol 70% kemudian 80% dan yang terakhir 90% masing-masing sebanyak 10 kali. Terakhir, sediaan dicelupkan ke dalam larutan *xylol* sebanyak 10 kali.

3.7 Variabel Penelitian

3.7.1 Variabel Bebas

Lama perlakuan hipoksia sistemik kronik selama 0 hari, 3 hari, 7 hari, dan 14 hari.

3.7.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim spesifik katalase pada otak tikus *Sprague Dawley*.

3.7.3 Variabel Antara

Pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dengan dosis 400 mg/kg/BB.

3.8 Definisi Operasional

3.8.1 Hipoksia

Definisi : Keadaan dimana oksigen pada sel dan jaringan rendah diakibatkan karena pemberian Oksigen 8% dan Nitrogen 92%

Alat ukur : Oksigen meter

Cara ukur : Gas dialirkan melalui oksigen meter dan dilihat kadarnya

Hasil Ukur : Numerik

Skala ukur : Interval

3.8.2 Enzim Spesifik Katalase

Definisi : Enzim yang berfungsi mengkatalisis perubahan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

Alat ukur : UV-Vis Spektrofotometri

Cara ukur : Supernatan diperiksa dengan menggunakan metode Mates.

Hasil Ukur : Numerik

Skala ukur : Interval

3.9 Instrumen Penelitian

3.9.1 Alat Penelitian

Hypoxia chamber 60cm x 40cm x 40cm, timbangan ohaus blender, kertas saring Whatman no. 1, vial, cawan penguap, *magnetic stirrer*, *rotatory evaporator*, oven, desikator, spuit 1 cc dan 3 cc, alat bedah/minor set, sterofom, perekat untuk fiksasi, gelas arlojijarum jahit, plastik klip, *freezer*, *microtube*, *micropipette*, alat penghalus organ / *grinder machine*, alat sentrifugasi, *vortex machine*, kertas label, UV-vis spektrofotometer, dan alat-alat standard yang ada dilaboratorium biokimia seperti tabung reaksi, gelas beker, gelas ukur, tabung labu, spatula, batang pengaduk dan sendok logam, botol semprot aquades, tabung dengan EDTA untuk menampung darah, dan kuvet kaca.

3.9.2 Bahan Penelitian

Otak dan darah tikus Sprague Dawley yang dihipoksia, larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7 dan 7,2, H₂O₂, tabung gas dengan kandungan nitrogen 92% dan Oksigen 8%, es batu, ketamine (10mg/mL) dan xylazine (100mg/mL), ekstrak buah *Aegle marmelos*, larutan standard kuersetin, metanol, akuades, etanol, H₂SO₄, NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%, NaOH 4% dan 10% , HCl, Na₂NO₃ 20% m larutan standard tannin, perekasi Meyer, pereaksi Dragendorf, logam magnesium, eter, asam asetat anhidrat, FeCl₃ 1%, larutan follin ciocalteu, bubuk DPPH, dan standard asam askorbat.

3.10 Pengumpulan Data

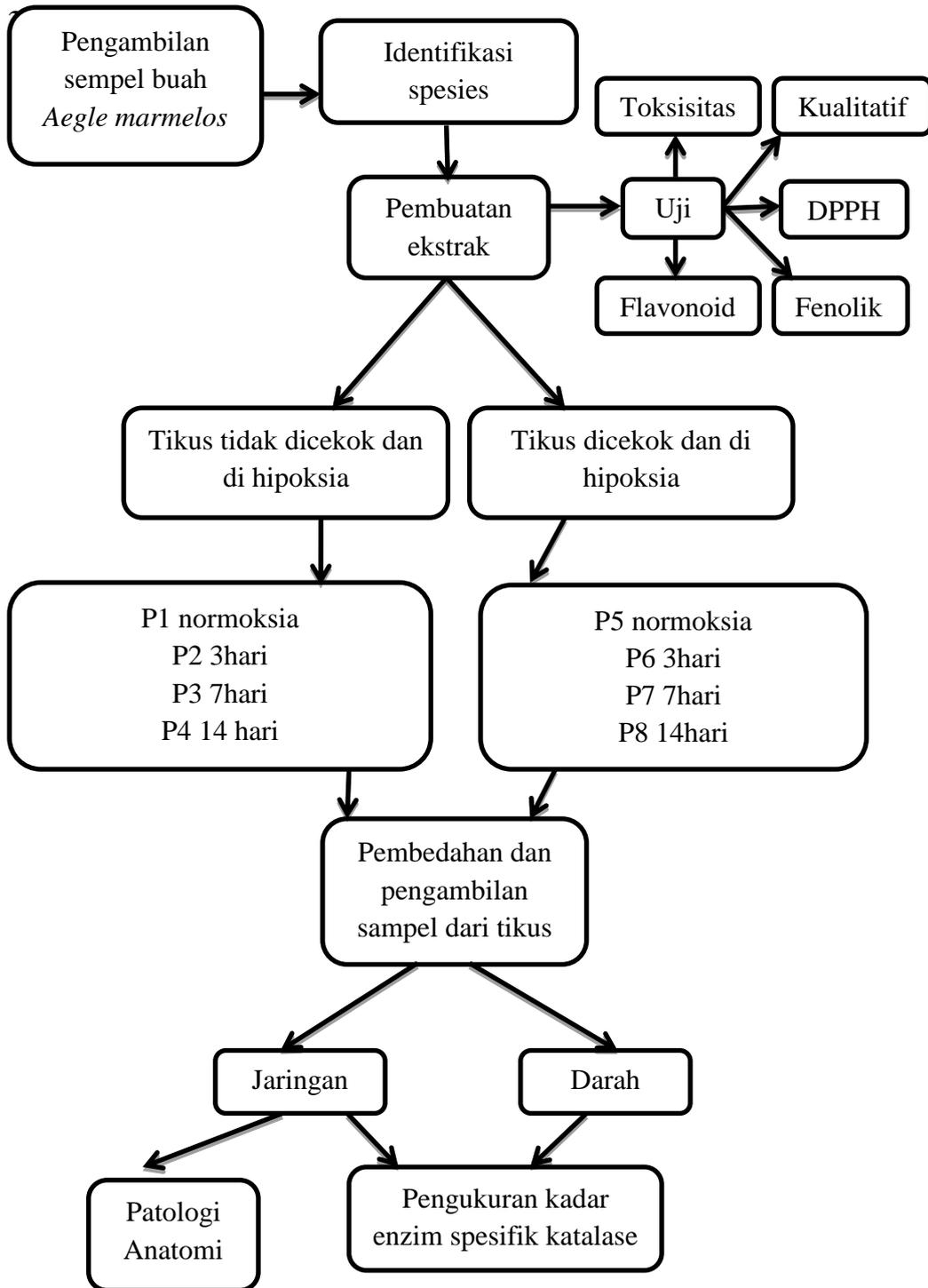
Parameter yang diperiksa pada penelitian ini adalah uji fitokimia kualitatif, kapasitas total antioksidan dengan DPPH, uji flavonoid, uji fenolik, uji toksisitas,

pengukuran kadar enzim spesifik katalase pada darah dan otak, dan pemeriksaan patologi anatomi jaringan otak.

3.11 Analisis Data

Uji statistik dalam penelitian ini untuk membandingkan antara organ dan darah menggunakan program statistik GraphPad Prism v.7.0 la jolla, CA, USA yaitu uji mann-whitney. Untuk mencari korelasi organ dan darah menggunakan pearson. Variabel yang dianalisis dianggap bermakna apabila $p < 0,05$.

3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.12 Alur Penelitian

3.14 Jadwal Pelaksanaan

Tabel 3.1 Jadwal Pelaksanaan Penelitian

	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei
	18	18	18	18	18
Uji fitokimia					
Uji pada tikus					
Pengambilan					
dan analisis					
data					
Penulisan					
laporan					
penelitian					
dan skripsi					