

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 11 Maret 2015 sampai dengan 11 April 2015 di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai tempat perlakuan hewan model. Laboratorium Kimia Fakultas Kimia Politeknik Negeri Malang sebagai tempat ekstraksi air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*). Pengukuran aktifitas enzim *Lipoprotein lipase* (LPL) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Fisiologi Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan preparat histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus berupa bak plastik dengan tutup kawat, timbangan, seperangkat alat bedah berupa *scalpel*, *blade*, gunting, dan pinset. Sonde lambung, spuit, pengaduk kaca, sentrifugator, *microtube*, *micropipet*, *yellow tip* dan *blue tip*, tabung reaksi, rak tabung, kaca objek dan kaca penutup, aluminium foil, penangas air, mikrotom potong beku, dan mikroskop Olympus BX51.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar umur 10 – 12 minggu dengan berat badan 110–130 gram, pakan standar BR-1, pakan tinggi lemak (kuning telur ayam mengandung kolestrol 250 mg/telur), *Propiltiourasil* (PTU) 0,02%, biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*), NaCl fisiologis 0,9%, paraformaldehid (PFA) 4%, alkohol bertingkat 80%, 90%, alkohol absolute, xylol, parafin cair, pewarna hematoksilin eosin (HE), serum, Reagent (Acetate buffer 100 mmol/L, Bromocresol Green 0,27 mmol/L, detergent), buffer isolasi lipase.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu :

1. Rancangan penelitian dan preparasi Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*).
2. Perhitungan dosis ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*).
3. Pembuatan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*).
4. Preparasi hewan model Hiperlipidemia dengan PTU 0,02% dan kuning telur ayam.
5. Terapi ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*).
6. Pengambilan serum darah dan organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*).
7. Pengukuran aktivitas enzim lipoprotein lipase (LPL) dari serum.
8. Pembuatan preparat histopatologi duodenum dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).
9. Analisa data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan model ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok (A) tikus kontrol negatif yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan, kelompok (B) tikus kontrol positif yaitu kelompok tikus hiperlipidemia tanpa diberi terapi ekstrak air biji lamtoro, kelompok (C) tikus hiperlipidemia dan diberi terapi ekstrak air biji lamtoro dengan dosis 0,25 g/kg BB, kelompok (D) tikus hiperlipidemia dan diberi terapi ekstrak air biji lamtoro dengan dosis 0,5 g/kg BB, kelompok (E) tikus hiperlipidemia dan diberi terapi ekstrak air biji lamtoro dengan dosis 1 g/kg BB. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan. Pengukuran aktivitas LPL dilakukan setelah pembedahan tikus untuk mengetahui hasil perlakuan. Diagram alir skema penelitian dapat dilihat pada **lampiran 1** dan rancangan penelitian ditunjukkan pada **Tabel 4.1**. Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Diet hiperlipidemia dan dosis ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*)

Variabel tergantung : Aktivitas enzim LPL dan gambaran histopatologi duodenum

Variabel kontrol : Jenis Kelamin, umur, berat badan, *Rattus norvegicus* galur wistar, kondisi eksperimental (suhu kandang, ruangan, pakan, minum)

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel yang Diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Aktivitas Enzim LPL dan Histopatologi duodenum				
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (Hiperlipidemia)				
Kelompok C (Terapi dosis 0,25 g/kg BB)				
Kelompok D (Terapi dosis 0,5 g/kg BB)				
Kelompok E (Terapi dosis 1 g/kg BB)				

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar, jantan, dengan berat badan 110 – 130 gram dan berumur 10-12 minggu. Tikus yang digunakan adalah tikus sehat yang ditandai dengan nafsu makan baik dan perilaku normal. Tikus diadaptasikan untuk menyesuaikan kondisi laboratorium selama 7 hari (Lamanepa, 2005). Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan rumus Kusningrum (2008) sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 P(n-1) &\geq 15 \\
 5(n-1) &\geq 15 \\
 5n - 5 &\geq 15 \\
 5n &\geq 20 \\
 n &\geq 4
 \end{aligned}$$

Keterangan :
 P = jumlah kelompok penelitian
 n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sebanyak 5 macam diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok atau sebanyak minimal 4 hewan coba. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini diadaptasikan selama 7 hari dengan pakan standar dan dikandangkan dalam 5 kandang kelompok A, B, C, D, dan E dengan jumlah masing-masing kelompok 4 ekor. Tikus

dikandangkan dalam kandang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Kandang terbuat dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya.

4.4.2 Preparasi dan Pembuatan Hiperlipidemia

Tikus yang digunakan dalam penelitian diadaptasikan terhadap lingkungan laboratorium selama tujuh hari dengan pemberian pakan berupa pakan standar pada semua tikus. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Tikus dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi dengan penutup bak yang terbuat dari kawat, dengan jumlah tikus 4 ekor tiap kandang disesuaikan dengan jumlah pengulangan setiap perlakuan. Pakan standar yang digunakan adalah BR-1 (**lampiran 16**).

Hewan model hiperlipidemia dibuat berdasarkan penelitian Febrina dkk (2009) yang menggunakan PTU 0,02% dan kuning telur ayam sebagai penginduksi yang dapat meningkatkan lipid secara endogen dan eksogen. PTU 0,02% diberikan sebanyak 10 mL/kg BB dan kuning telur ayam diberikan sebanyak 10 mL/kg BB setiap hari selama 10 hari. Diagram alir pembuatan hewan model hiperlipidemia dapat dilihat pada **lampiran 4**.

Tikus kelompok B diberikan PTU 0,02% sebanyak 10 mL/kg BB dan kuning telur ayam sebanyak 10 mL/kg BB dengan sonde kemudian diberikan pakan standar sebanyak 16,78 gr/ekor /hari 1 jam setelahnya selama 10 hari, tikus kelompok C, D dan E diberikan PTU 0,02% sebanyak 10 mL/kg BB dan kuning telur ayam sebanyak 10 mL/kg BB dengan sonde kemudian

diberikan pakan standar sebanyak 16,98 gr/ekor/hari 1 jam setelahnya selama 10 hari, sedangkan pada kelompok A diberikan pakan standar sebanyak 20 gram/ekor/hari selama 10 hari dan air minum secara *ad libitum*.

4.4.3 Perhitungan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Air Biji Lamtoro

(*Leucaena leucocephala*)

Terapi ekstrak air biji lamtoro dilakukan pada kelompok C, D, dan E. Perhitungan dosis biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) merujuk pada penelitian Nurhasanah dan Syamsudin (2005) yang terdiri dari tiga macam dosis, yaitu 0,25 g/kg BB, 0,5 g/kg BB, dan 1 g/kg BB. Dosis terapi yang diberikan pada kelompok C 0,25 g/kg BB/hari, pada kelompok D 0,5 g/kg BB/hari, dan pada kelompok E 1 g/kg BB/hari. Berdasarkan dosis tersebut, maka dengan berat tikus 120 gram diperoleh dosis 30 mg/ekor/hari pada kelompok C, sedangkan pada kelompok D dosis yang diberikan 60 mg/ekor/hari, dan pada kelompok E dosis yang diberikan sebanyak 120 mg/ekor /hari. Diagram alir perhitungan dosis ekstrak air biji lamtoro dapat dilihat pada **lampiran 5**.

Biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) yang diperoleh dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel, kemudian dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Metode pembuatan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) dilakukan dengan menggunakan pelarut air. Menurut Sulistyowati (2007), ekstrak air biji lamtoro mempunyai kandungan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol biji lamtoro. Biji lamtoro yang telah kering kemudian ditimbang sebanyak 25 g. Biji

lamtoro kemudian dimasukkan kedalam masing-masing *baeker glass* yang berisi aquades 500 mL. Selanjutnya direbus pada temperatur 70°C hingga air rebusan tinggal 50 mL dan disaring menggunakan kertas saring sehingga didapatkan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*). Sediaan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) dipersiapkan setiap hari selama 14 hari. Diagram alir pembuatan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) dapat dilihat pada **lampiran 6**.

4.4.4 Pemberian Terapi Ekstrak Air Biji Lamtoro

(*Leucaena leucocephala*)

Metode pemberian terapi ekstrak air biji lamtoro dilakukan dengan cara per oral berdasarkan Nurhasanah dan Syamsudin (2005). Tikus pada kelompok yang telah diinduksi hiperlipidemia selama 10 hari, diterapi dengan ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) dosis 0,25 g/kg BB pada kelompok C, dosis 0,5 g/kg BB pada kelompok D dan dosis 1 g/kg BB pada kelompok E diberikan selama 14 hari setelah pemberian induksi hiperlipidemia. Pemberian dilakukan dengan cara sonde lambung. Ekstrak air biji lamtoro (*Leucaena leucocephala*) diberikan sebanyak 2 mL/hari dengan dosis 0,25 g/kg BB untuk kelompok C, 2 mL/hari dengan dosis 0,5 g/kg BB untuk kelompok D, dan sebanyak 2 mL/hari dengan dosis 1 g/kg BB untuk kelompok E. Pemberian terapi dilakukan selama 14 hari. Dosis pemberian ekstrak air biji lamtoro dapat dilihat pada **lampiran 7**.

4.4.5 Metode Pengukuran Kadar Lipid dalam Darah

Pengukuran kadar lipid dalam darah dilakukan pada hari ke-5 dan ke-10 setelah pemberian diet hiperlipidemia. Hal ini dilakukan untuk memantau peningkatan kadar lipid pada hewan coba. Pengukuran kadar lipid tersebut dilakukan dengan cara mengambil darah melalui vena *coccigealis* yang diteteskan kedalam *Cholestrol Test Strips*. Darah yang telah diteteskan kedalam alat tersebut ditunggu lima menit kemudian dibaca hasilnya dan dibandingkan dengan literatur. Hasil pengukuran kadar lipid dalam darah dapat dilihat pada **lampiran 15**.

4.4.6 Pengambilan Sampel Serum dan Duodenum

Serum digunakan untuk mengukur aktivitas enzim lipoprotein lipase (LPL) dari serum tikus pada hari ke 25 setelah perlakuan. Metode pengambilan serum dan organ duodenum berdasarkan Sirois (2005). Hari ke 24 tikus diinjeksi dengan heparin 100 IU/kg BB secara subcutan dengan terlebih dahulu dipuaskan selama 12 jam. Setelah 12 jam pasca pemberian heparin, tikus dipuaskan kembali selama 12 jam untuk koleksi serum dan organ duodenum. Langkah awal yang dilakukan yaitu melakukan euthanasi hewan coba dengan dislokasi leher. Tikus diletakkan pada papan nekropsi dengan posisi rebah dorsal, permukaan tubuh hewan coba dibasahi dengan etanol atau air, selanjutnya dengan menggunakan *forceps*, kulit bagian abdomen hewan coba tersebut diangkat dan dilakukan insisi sepanjang *ventral midline* (Linea alba). Kemudian dilakukan insisi kembali pada bagian muskulus dibawah kulit abdomen agar terlihat organ pada rongga abdomen.

Insisi dilanjutkan pada bagian thorax. Thorax diinsisi pada *cartilago costae*, kemudian dikuakkan. Darah diambil intracardiac dengan spuit 5 mL.

Pengambilan organ duodenum dilakukan setelah pengambilan darah. Organ yang diambil kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9 % dan direndam larutan Paraformaldehid (PFA) 4 % untuk preparat duodenum dan disimpan pada suhu ruang. Diagram alir koleksi serum dan organ duodenum dapat dilihat pada **lampiran 8**.

4.4.7 Pengujian Aktivitas Enzim LPL

4.4.7.1 Isolasi Enzim Lipoprotein Lipase (LPL)

(Modifikasi metode oleh : Summer and Myrback, 1972; Alexander *et al.*, 1985).

Darah yang telah diperoleh melalui intracardiac kemudian dimasukkan dalam tabung *vacutainer*, diletakkan pada posisi miring 45 °C dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar 27 °C selama ± 3,5 jam. Koleksi serum dilakukan dengan cara disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Serum selanjutnya diambil dan dimasukkan dalam tabung *vacutainer* dan disimpan di *refrigerator* pada suhu 4 °C.

Enzim diisolasi dari serum. Setelah disentrifugasi dan terpisah antara endapan dan supernatan, supernatan diberi larutan pengestrak. Setelah itu disentrifugasi kembali dan diambil endapannya. Kemudian endapan diberi etanol dingin selanjutnya disentrifuse kembali untuk diambil endapannya. Kemudian endapan ditambah dengan buffer pH 6,8 dan disimpan pada suhu -20 °C untuk diuji aktivitasnya. Diagram alir isolasi enzim dapat dilihat pada **lampiran 9**.

4.4.7.2 Uji Aktivitas LPL

Pada tahapan ini akan dilakukan uji aktivitas enzim LPL pada kondisi suhu, waktu inkubasi, pH dan konsentrasi substrat yang optimum. Uji aktivitas dilakukan pada semua kelompok percobaan. Larutan enzim LPL ditambahkan pada larutan emulsi, kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C. Selanjutnya campuran tadi dididihkan dalam air mendidih selama kurang lebih 10 menit. Kemudian ditambahkan indikator PP dan selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai terjadi warna merah muda. Diagram alir uji aktivitas enzim LPL dapat dilihat pada **lampiran 10**.

Aktivitas LPL adalah kemampuan LPL dalam menghidrolisa trigliserida (Merkel *et al.*, 1998). Satu unit aktivitas enzim LPL adalah didefinisikan sebagai jumlah mikromol dari asam kolestrol bebas per mililiter enzim permenit perdesiliter darah pada kondisi optimum.

Rumus yang digunakan (Dian, 2002):

$$\text{AKTIVITAS} = \frac{M \text{ NaOH} \times V \text{ NaOH} \times fp \times T}{VE \times T}$$

Keterangan :

M NaOH : Konsentrasi NaOH
V NaOH : Volume NaOH
Fp : Faktor pengenceran
VE : Volume enzim
T : Waktu inkubasi (menit)

4.4.8 Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan HE

(Junqueira *and* Carneiro 2007)

Langkah – langkah dalam proses pembuatan preparat histopatologi meliputi *fiksasi, dehidrasi, clearing, embedding, sectioning*, pewarnaan HE dan pengamatan preparat histopatologi. Diagram alir pembuatan preparat dengan pewarnaan HE dapat dilihat di **lampiran 11**.

1. Fiksasi

Fiksasi dilakukan untuk mengawetkan dan mengeraskan jaringan. Tikus dimatikan dengan cara dislokasi leher, selanjutnya dibedah dan diambil organ usus halus dan dipotong bagian duodenum. Potongan tersebut dimasukkan dalam larutan PFA 4 % selama 18-24 jam.

2. Dehidrasi dan Infiltrasi

Dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan yang telah difiksasi. Jaringan dimasukkan ke dalam etanol 70% selama 1 jam kemudian didehidrasi dengan etanol bertingkat 80%, 90% sampai 95%. Jaringan direndam didalam larutan etanol absolut selama 3x30 menit pada suhu ruang.

3. Penjernihan (*Clearing*)

Clearing adalah tahap mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Reagen yang digunakan dalam penjernihan adalah xylol. Proses *clearing* dilakukan dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut 3 ke dalam larutan xylol. Penjernihan dilakukan dalam

larutan xylol I selama 1 jam, xylol II selama 1 jam, dan xylol III selama 30 menit pada suhu kamar dengan diletakkan dalam inkubator.

4. Infiltrasi Parafin

Infiltrasi parafin adalah tahap keempat dalam pembuatan preparat. Tahap ini bertujuan untuk menggantikan posisi dehidran di dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair I, parafin II, dan parafin III dimana masing-masing diletakkan ke dalam oven selama 1 jam.

5. Penanaman Jaringan (*Embedding*)

Embedding adalah proses untuk mengeluarkan cairan *clearing agent* dari jaringan dan diganti dengan parafin. Proses *embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan duodenum dalam paraffin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat paraffin akan memadat. Pembuatan preparat duodenum dengan memasukkan hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*).

6. *Sectioning*

Sectioning diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4 \mu\text{m}$. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40 °C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40 °C sampai kering. Selanjutnya, preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C selama 24 jam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

7. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Pewarnaan HE ini terdiri dari zat warna yaitu hematosiklin dan eosin.

Diawali proses deparafinasi yaitu preparat dimasukkan dalam xylol 1 dan 2 selama 5 menit. Selanjutnya proses rehidrasi preparat, dimasukkan dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, 95 %, 90 %, 80 %, dan 70% selama 5 menit. Jaringan kemudian direndam dalam aquades selama 5 menit. Tahapan selanjutnya proses pewarnaan, preparat diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas aquades selama 5 menit sebelum diwarnai eosin. Setelah itu, preparat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan dibilas aquades selama 5 menit. Setelah preparat diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat pada alkohol dari 80 %, 90 %, dan 95 % hingga alkohol absolut. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan memasukkan xilol I-III selama 3 menit dan dikeringkan dengan dianginkan. Tahapan terakhir yaitu dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan balsem Canada serta ditutup menggunakan *coverglass*.

8. Pengamatan Preparat Histopatologi

Hasil pengamatan preparat histopatologi duodenum dilakukan pembesaran mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan pembesaran kuat 400x dan 1000x untuk melihat adanya perubahan histopatologi duodenum.

4.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran aktivitas enzim LPL ditabulasi menggunakan *Microsoft Office Excel*. Selanjutnya data dianalisis menggunakan *SPSS rev.16,0* dengan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*), jika terjadi beda nyata dilanjutkan dengan uji *Tukey* $\alpha = 0,05$. Sedangkan data yang diperoleh dari pembuatan preparat histopatologi jaringan pada organ duodenum dianalisis secara deskriptif (Candiasa, 2003).