

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2013 – September 2014 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi (POLTEK), Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus rata-rata 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 kelompok maka minimal dilakukan 5 kali ulangan dalam setiap kelompok sehingga total tikus yang dibutuhkan 20 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol sehat, kelompok sakit IBD, kelompok terapi ekstrak akar seledri dengan dosis 100 mg/kg BB dan kelompok terapi 300 mg/kg BB (**Tabel 4.1**). Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus sebagai ulangan.

Tabel 4.1 Kelompok perlakuan tikus

Kelompok Tikus	Perlakuan
A (Kontrol)	Tikus kontrol, yaitu tikus tanpa perlakuan hanya diberi minum dan ransum standard berbentuk butiran
B (Indometasin)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB tanpa diberikan terapi
C (Terapi dengan dosis 100 mg/kg BB)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi ekstrak etanol akar seledri dosis 100 mg/kg BB sebanyak 2 ml selama 14 hari dengan cara sonde lambung
D (Terapi dengan dosis 300 mg/kg BB)	Kelompok tikus diberikan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dan diberikan terapi ekstrak etanol akar seledri dosis 300 mg/kg BB sebanyak 2 ml selama 14 hari dengan cara sonde lambung

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian Indometasin dan ekstrak etanol akar seledri

Variabel tergantung : Aktivitas enzim protease dan MDA

Variabel kendali : Tikus strain Wistar jantan umur 8-12 minggu dan berat badan rata-rata 150-200 gram, pakan, minum dan kandang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, mikro pipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), tabung reaksi, penangas air, waterbath, stirer, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, *sentrifuge*, inkubator, *vortex*, spektrofotometri UV, *autoclave*, sarung tangan, oven dan spuit 3 ml.

4.5.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, ekstrak etanol akar seledri, minyak jagung, PBS- Azida, PFA 37%, KCl, KH_2PO_4 , NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaOH, PBS-*Tween* : PMSF (*Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*) 1:9, pasir kwarsa, Etanol 70%, Etanol 80%, Etanol 90%, Etanol 95%, air hangat, Tris-HCl, kasein, tirosin, buffer fosfat pH 7, akuades steril, Tri

Chloro acetic Acid (TCA), larutan PBS, larutan baku MDA, Na-Thio dan HCl.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum standard berbentuk butiran pada semua tikus. Komposisi ransum disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities (AOAC)* (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang terbuat dari plastik yang mudah dibersihkan dan disanitasi.

4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan pada tikus adalah 15 mg/kg BB. Indometasin diberikan secara per oral. Sebelum diberikan pada tikus, indometasin dilarutkan terlebih dahulu dengan minyak jagung. Minyak jagung ini berfungsi sebagai pelarut. Indometasin yang sudah dihitung

dosisnya, ditambah dengan minyak jagung (dalam 45 mg indometasin ditambahkan 4 ml minyak jagung). Setelah itu dilakukan *vortex* untuk melarutkan indometasin. Kemudian indometasin diberikan ke tikus secara per oral (sonde lambung) sebanyak 15 mg/kg BB (**Lampiran 5**).

4.6.3 Tata Laksana Pemberian Ekstrak Etanol Akar Seledri Per Oral

Dosis pemberian ekstrak etanol akar seledri yaitu 100 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB diberikan pada hari ke 2 setelah induksi indometasin. Masing-masing kelompok terapi terdapat 5 ekor tikus. Ekstrak etanol akar seledri diberikan dengan cara sonde lambung sebanyak 2 ml tikus setiap pagi selama 14 hari.

4.6.4 Pengambilan Organ *Duodenum*

Pengambilan organ *duodenum* pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-15 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher, tikus diposisikan rebah dorsal pada papan pembedahan, kemudian dilakukan insisi pada abdomen, diambil bagian *duodenum* dan dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. *Duodenum* dimasukkan ke dalam larutan *Phosphate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 untuk menjaga protein dalam organ agar tidak rusak.

4.6.5 Isolasi Protease

Isolasi Protease pada organ *duodenum* dilakukan dengan memotong organ *duodenum* menjadi lebih kecil dengan menggunakan gunting bedah

dan ditimbang sebesar 0,5 gram. Kemudian ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL yang ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar yang diletakkan diatas blok es.

Homogenat *duodenum* dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclave* ditambah larutan PBS-Tween : PSMF (9 :1) sebanyak 2 mL. Homogenat yang diperoleh dilakukan *vortex* selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Endapan yang diperoleh disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm) dan dikeringkan sampai bau etanol hilang, kemudian ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Aulanni'am, 2004).

4.6.6 Penentuan Aktivitas Protease

4.6.6.1 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Pada pembuatan kurva buku tirosin pertama disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 ppm. Setelah itu ditambah akuades sampai tanda batas, kemudian tabung ditutup dengan alumunium foil. Larutan baku tiroksin dengan konsentrasi berbeda diukur serapannya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada λ maksimal= 275 nm. Blanko yang digunakan adalah akuades (Aulanni'am, 2004).

4.6.6.2 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi *Duodenum*

Pada pengukuran Aktivitas protease yang dilakukan adalah memasukkan kasein 500 ppm ke tabung reaksi sebanyak 200 μL dengan cara dipipet, ditambah 300 μL larutan buffer fosfat pH 7, ditambah 100 μL enzim protease dan didiamkan pada suhu 37°C di inkubator selama 60 menit. Homogenat ditambah 400 μL larutan TCA 4% kemudian didiamkan pada suhu 27°C (suhu kamar) selama 30 menit. Homogenat diputar dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Lalu supernatan diambil 100 μL dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim.

Berdasarkan metode Aulanni'am (2004) Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana :
 v = volume total sampel (mL)
 q = waktu inkubasi (mL)
 f_p = faktor pengenceran
 p = jumlah enzim (mL)

4.6.7 Pengukuran Kadar MDA (Malondialdehida)

4.6.7.1 Pembuatan Kurva Standar MDA

Larutan stok MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 µg/ml masing-masing diambil 100 µL, dimasukkan dalam tabung reaksi berbeda yang ditambah 550 µl aquades. Masing-masing tabung yang berisi 650 µl larutan standar ditambah 100 µl TCA 100%, 250 µL HCl 1 N dan 100 µL Na-Thio 1%, kemudian dihomogenkan dengan *vortex*, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil lalu diinkubasi dengan penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4 µg/ml diukur absorbansi pada panjang gelombang 500-600 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum MDA. Kurva standar MDA diperoleh dengan pengukuran absorbansi MDA pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8 µg/ml) pada panjang gelombang maksimum (Amin, dkk., 2009).

4.6.7.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji Thiobarbituric Acid (TBA)

Jaringan *duodenum* dari setiap kelompok masing-masing diambil sebanyak 0,1 gram dipotong kecil-kecil, ditambah 1 ml NaCl 0,9%, digerus dalam mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Homogenat dipindah ke dalam microtube dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya.

Supernatan *duodenum* diambil 100 μ L, ditambah 550 μ L akuades, ditambah 100 μ L TCA, ditambah 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-Thio. Setiap penambahan reagen larutan dihomogenkan dengan *vortex*. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit, setelah itu supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada microtube baru. Supernatan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 100°C selama 30 menit, selanjutnya supernatan dibiarkan pada suhu ruang sekitar 20-25°C. Sampel diukur absorbansinya pada λ max (532 nm) untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Amin, dkk., 2009).

4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil perlakuan aktivitas protease dan malondialdehida akan dianalisis menggunakan Analisis Ragam *ANOVA* dan uji lanjutan *BNJ* (beda nyata jujur) $\alpha= 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (kusriningrum, 2008).